

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 3 月 18 日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/022731 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 7/00, 15/867 (74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/011299
- (22) 国際出願日: 2003 年 9 月 4 日 (04.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-258576 2002 年 9 月 4 日 (04.09.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ディナベック研究所 (DNAVEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 雅典 (KOBAYASHI, Masanori) [JP/JP]; 〒566-0022 大阪府 摂津市 三島 2-5-1 塩野義製薬株式会社 創薬研究所内 Osaka (JP). 上田 泰次 (UEDA, Yasuji) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP). 長谷川 護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県 つくば市 観音台 1 丁目 2 5 番 1 1 号 株式会社ディナベック研究所内 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING VIRUS VECTOR CONTAINING MEMBRANE PROTEIN HAVING SIALIC ACID-BINDING ACTIVITY IN ENVELOPE WITH THE USE OF GRAM-POSITIVE BACTERIUM-ORIGIN NEURAMINIDASE

(54) 発明の名称: シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターをグラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法

(57) Abstract: It is intended to provide a process for producing a virus vector, which contains a membrane protein having an activity of binding to sialic acid in its envelope, by using neuraminidase (NA) originating in a gram-positive bacterium. This process involves the step of culturing cells capable of producing the virus vector in the presence of NA originating in the gram-positive bacterium and then collecting the thus produced virus. According to this process, a virus having a high titer can be produced at a high cost performance. The thus produced virus vector is capable of highly efficiently transferring a gene into cells to which a gene can be hardly transferred by the existing methods (for example, blood cells and hematopoietic cells including hematopoietic stem cells, cells having mucus including mucosal epithelial cells and so on) and, therefore, is useful as a vector for gene therapy.

(57) 要約: 本発明は、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターをグラム陽性菌由来ノイラミニダーゼ(NA)を用いて製造する方法を提供する。この方法は、グラム陽性菌由来NAの存在下で該ウイルスベクター産生細胞を培養し、産生されたウイルスを回収する工程を含む。本発明の方法により、高いコストパフォーマンスで高力価のウイルスを製造することができる。製造されるウイルスベクターは、造血幹細胞を含む血球系・造血系細胞、および粘膜上皮細胞を含む粘液を有する細胞などの、従来では遺伝子導入が困難であった細胞に対して高率で遺伝子を導入する能力を持つことから、遺伝子治療用ベクターとして有用である。

WO 2004/022731 A1

BEST AVAILABLE COPY

明細書

シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターを
グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを用いて製造する方法

技術分野

本発明は、グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを用いて、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターを製造する方法に関する。

背景技術

ほとんどの細胞表面には、シアル酸を含む糖蛋白質が存在している。ある種のウイルスは、このシアル酸と結合する蛋白質をウイルスのエンベロープに有しており、ウイルス粒子の細胞への吸着に機能している。例えば、インフルエンザウイルスは、エンベロープ蛋白質の1つであるヘマグルチニン (hemagglutinin; HA) を介して細胞の表面に存在するシアル酸に結合する。しかしながら、ウイルス複製過程において出芽の際には宿主細胞表面のシアル酸との結合を切断する必要があり、そのためにインフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ (neuraminidase; NA) が大きな役割を果たしている。また、NAは自己凝集の阻止にも働いていることが報告されている (Compans, R. W. et al., 1969, J. Virol. 4: 528-534; Palese, P. et al., 1974, Virology 61: 397-410; Griffin, J. A. et al., 1983, Virology 125: 324-334; Liu, C. et al., 1995, J. Virol. 69: 1099-1106)。

HA蛋白質の性質を利用して、遺伝子導入能を改良したHAシェードタイプ化ウイルスの作製も試みられている。この場合、ノイラミニダーゼが存在しないと、低い力価のウイルスしか産生させることができない (Hatzioannou, T., et al., 1

998, J. Virol. 72 : 5313-5317)。ベクターの生産系に外来的にNAを供給することにより、HA蛋白質のビリオンへの取り込みを促進し、力価も上昇させることができる (Dong, J., et al., 1992, J. Virol. 66 : 7374-7382; Negre, D., et al., 2000, Gene Ther. 7: 1613-1623; Morse, K. M., et al., 2002, The American Society of Gene Therapy's 5th Annual Meeting; 国際公開番号第W001/92508号)。しかしながら、これまでに用いられている精製NAで産生されるHAシュードタイプ化ウイルスの力価は満足できるものではない。

発明の開示

本発明は、グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを用いて、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターを製造する方法を提供することを課題とする。

これまでHAシュードタイプ化ウイルスの産生などにおいては、グラム陰性菌に属するビブリオコレラ菌 (*Vibrio cholerae*) 由来のNAがしばしば用いられてきた。しかしながら、ビブリオコレラ菌由来NAを用いて産生されるベクターの力価は低く、また、コストの面においてベクターを工業的に大量生産することは困難であった。本発明者らは、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターを高力価で、しかもより安価に製造する技術を開発するため、ウイルス生産に用いることができる新しいNAの探索を行った。その結果、グラム陽性菌由来のNAを用いることにより、ビブリオコレラ菌由来NAに比べ有意に高い力価のウイルスを産生させることに成功した。グラム陽性菌由来のNAを用いることにより、シュードタイプ化ベクターの工業的な大量生産が効率的かつ経済的に実施可能となる。

すなわち本発明は、グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを用いて、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターを製造する方法

に関し、より具体的には、

- (1) シアル酸結合活性を有する膜蛋白質を含むウイルスベクターの製造方法であって、グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼの存在下で該ウイルスベクター産生細胞を培養し、産生されたウイルスを回収する工程を含む方法、
- (2) グラム陽性菌が放線菌である、(1)に記載の方法、
- (3) 放線菌が、ミクロモノスポラ科 (*Micromonosporaceae*) に属する放線菌である、(2)に記載の方法、
- (4) ミクロモノスポラ科に属する放線菌が、ミクロモノスポラ・ビリディファシエンス (*Micromonospora viridifaciens*) である、(3)に記載の方法、
- (5) ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、(1)から(4)のいずれかに記載の方法、
- (6) レトロウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、(5)に記載の方法、
- (7) シアル酸結合活性を有する膜蛋白質が、一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスのエンベロープ蛋白質である、(1)から(6)のいずれかに記載の方法、
- (8) 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスが、パラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) またはオルトミクソウイルス科 (*Orthomyxoviridae*) に属するウイルスである、(7)に記載の方法、
- (9) シアル酸結合活性を有する膜蛋白質が、インフルエンザウイルスのHA蛋白質である、(1)から(6)のいずれかに記載の方法、
- (10) (1)から(9)のいずれかに記載の方法により製造されたウイルス、に関する。

本発明は、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープを含むウイルスベクターを製造する方法を提供する。本発明において「ウイルスベクター」とは、宿主内に核酸分子を導入する能力を有するウイルス粒子またはそれと同等の感

染性微粒子を指す。本発明の方法は、ウイルスベクター産生細胞をグラム陽性菌由来ノイラミニダーゼの存在下で培養し、産生されたウイルスを回収する工程を含む方法である。グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを用いることにより、ウイルス産生細胞から回収されるウイルス量を有意に増大させることが可能となる。グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼは、好ましくは放線菌由来である。本発明の方法は、細胞膜由来のエンベロープを有する所望のウイルスベクターの製造において適用することができる。本発明の方法は、好ましくは、例えばネガティブ鎖RNAウイルス、レトロウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルスなどの製造において適用されるが、特にレンチウイルスを含むレトロウイルスの生産に本発明の方法を好適に適用することができる。

製造されるウイルスは、複製能を持つウイルス (replication competent viruses) であっても、複製欠損型ウイルス (replication deficient viruses) であってもよい。例えば複製欠損型のウイルスベクターは、ウイルスゲノムから、感染性ウイルス粒子の形成または放出に役割を持つウイルス遺伝子の一部または全部を欠損させることにより作製される。すなわち、ウイルスゲノムのウイルス粒子内への取り込み、および標的細胞への核酸の導入に必要な核酸配列を残し、エンベロープ遺伝子などを欠損させるようにウイルスゲノムを改変することにより、所望の遺伝子を細胞に導入するために適した複製欠損型の組み換えウイルスベクターを製造することができる。例えば複製欠損型のレトロウイルスベクターであれば、ウイルスゲノムRNA中のgag、pol、envなどのウイルス蛋白質遺伝子の一部または全部を取り除き、ウイルスのパッケージングおよび標的細胞への遺伝子導入に必要な配列 (LTRの一部など) のみを残すようにウイルスベクターのゲノムを改変することができる。ウイルス粒子の産生に際しては、欠損させた遺伝子のうち、ウイルス粒子形成に必要な遺伝子をウイルス産生細胞内で発現させる。このように野生型ウイルスが持つウイルス遺伝子の少なくとも一部を失っている核酸をウイルスゲノムとして含むウイルス粒子も、本発明においてウイルスベクター

に含まれる。

本発明は、特に組み換えウイルスの製造において好適に用いられる。「組み換えウイルス」とは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成したウイルスを言う。組み換えポリヌクレオチドとは、片方または両方の末端が自然の状態と同じようには結合していないポリヌクレオチドを言う。具体的には、組み換えポリヌクレオチドは、人の手によってポリヌクレオチド鎖の結合が改変（切断または結合）されたポリヌクレオチドである。組み換えポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド合成、ヌクレアーゼ処理、リガーゼ処理等を組み合わせて、公知の遺伝子組み換え方法により生成させることができる。組み換え蛋白質とは、組み換えポリヌクレオチドを介して生成した蛋白質または人工的に合成された蛋白質を言う。例えば、蛋白質をコードする組み換えポリヌクレオチドを発現させることにより、組み換え蛋白質を生産することができる。組み換えウイルスは、遺伝子操作により構築されたウィルスゲノムをコードするポリヌクレオチドを発現させ、ウイルスを再構築することによって生成することができる。

本発明の方法において製造されるウイルスベクターは、ウイルスエンベロープにシアル酸結合活性を有する蛋白質を有している。製造されるウイルスベクターとしては、天然においてシアル酸結合活性を有する蛋白質を持つウイルスであってもよく、天然においてはそのような蛋白質を持たないウイルスであって、人為的に該蛋白質をエンベロープに持たせたウイルスであってもよい。このように、天然型ウイルスのエンベロープには全くまたはほとんど含まれないある蛋白質をエンベロープに持たせたウイルスを、その蛋白質によりシュードタイプ化したウイルスという。異種エンベロープ蛋白質を持つシュードタイプウイルスは、例えばウイルス産生細胞において、その蛋白質を発現させることにより製造することができる。本発明の方法においては、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質でシュードタイプ化されたウイルスの製造において特に好適に適用することができる。

シアル酸結合活性を有する膜蛋白質としては、該蛋白質の細胞外領域にシアル

酸結合領域を持つものが使用される。このような蛋白質としては、天然の蛋白質であるか人工的な蛋白質であるかは特に制限されない。天然においてシアル酸結合活性を有する膜蛋白質は、例えばウイルスのエンベロープ蛋白質などに多く見いだされている。このような蛋白質は、例えばヘマグルチネーション (Hemagglutination, HA; 赤血球凝集反応) を起す活性により同定することができる。HA活性を持つウイルス蛋白質は、ヘマグルチニン (hemagglutinin; 赤血球凝集素) と呼ばれることもある。このHA活性を持つウイルス蛋白質は、本発明のウイルスの製造において特に好適に用いられる。

これまでに様々なウイルスにおいてHA活性が検出されている。これらのウイルスが持つHA活性を持つ蛋白質をそのまま、あるいは他の蛋白質とのキメラ蛋白質を作製することなどにより改変して、本発明のウイルス製造に用いることができる。HA活性は、種々の生物の赤血球を利用して検出することができる。HA活性の検出によく用いられる赤血球の種類および反応の至適温度は、各ウイルスによって適宜調節される。風疹ウイルスなどにおいては、反応にカルシウムイオンが必要であると言われている。アルボウイルスにおいては、反応の至適pHは厳密である。ウイルスのHA活性を持つ蛋白質としては、エンテロウイルス、風疹ウイルスなどではビリオンそのもの、アルボウイルス、アデノウイルスなどではビリオン以外にもビリオンより小さい粒子としても存在する。ポックスウイルスのヘマグルチニンはビリオンとは別の脂質を含む粒子として存在する。このようなHA活性を持つ蛋白質を用いて、HA活性を持つウイルスを製造することができる。アデノウイルスIII亜群のウイルスなどは、ラットの赤血球を部分凝集させる不完全凝集を起すが、このような蛋白質もHA活性を持つ膜蛋白質として用いることができる。

HA活性 (HA価) は公知の方法により試験することができる (国立予防衛生研究所学会編, 改訂二版 ウイルス実験学 総論, pp. 214-225, 丸善株式会社)。赤血球としては、例えばニワトリ (ヒヨコおよび成鶏を含む)、ガチョウ、ラット

、モルモット、アカゲザル、ミドリザル、またはヒトなどの赤血球が用いられ得る。反応温度は、0℃、4℃、室温、または37℃など、蛋白質により適した条件で行う。各ウイルスの赤血球凝集反応の反応条件の例を以下に示す。

例えばアデノウイルスのHA反応は、通常、pHに非依存的であり、温度は例えば37℃で行う。アデノウイルスのI亜群、例えば 3, 7, 11, 14, 16, 20, 21, 25, および 28 型などにおいては、例えばアカゲザル赤血球を用いるとよい。II亜群、例えば 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, および 27 型などにおいては、例えばラット赤血球を用いるとよい。III亜群、例えば 1, 2, 4, 5, および 6 型などにおいては、例えばラット赤血球を用いるとよく、不完全凝集が起こる。

エンテロウイルスのHA反応は、通常、pHに非依存的である。その中でも、例えばA7型などのコクサッキーウイルスの場合は、例えばニワトリ赤血球が用いられ、室温で凝集を起こす。A20, A21, A24型などのコクサッキーウイルスの場合は、例えばヒトO型赤血球が用いられ、4℃で凝集反応を起こす。コクサッキーウイルス B1, B3, B5型などの場合は、例えばヒトO型赤血球が用いられ、37℃で凝集反応を起こす。エコーウイルス、例えば 3, 6, 7, 11, 12, 13, 19, 20, 21, 24, 29型などにおいては、例えばヒトO型赤血球が用いられ、4℃で凝集反応を起こす。

レオウイルスのHA反応は、通常、pHに非依存的であり、室温で反応が起きる。例えば1型および2型はヒトO型赤血球が、3型はウシ赤血球が用いられる。

マイナス鎖RNAウイルスのHA反応は、例えばインフルエンザウイルスにおいては、pHは約7.2で行う。A型およびB型の場合はニワトリ、ヒト、またはモルモットなどの赤血球が用いられ、室温で反応が起きる。C型の場合は例えばニワトリ赤血球が用いられ、反応は4℃がよい。おたふくかぜウイルスおよびニューカッスル病ウイルス (NDV) の場合は、例えばニワトリ赤血球が用いられ、室温、pH約7.2で行うとよい。パラインフルエンザウイルスのHA反応は通常pH非依存的であり、1型などではニワトリまたはヒト赤血球が、2型の場合は例えばニワトリ赤血球が用いら

れ、反応は例えば4℃で行う。パラインフルエンザウイルス3型の場合は、ヒトまたはモルモット赤血球が用いられ、4℃～室温で反応させる。はしかウイルスの場合は、例えばミドリザル赤血球を用いて、37℃で反応させる。

アルボウイルスの場合は、反応は酸性側に厳密であり、例えばガチョウまたはヒヨコ赤血球を用いて37℃で反応させる。ラブドウイルスの場合は、例えばガチョウ赤血球を用いて反応を行う。狂犬病ウイルスの場合はpHは6.4が好ましく、温度は例えば0℃で、水疱性口内炎ウイルス（VSV）の場合は、pHは5.8が好ましく、温度は例えば0℃で反応させる。ワクチニアウイルスおよび痘そうウイルスなどを含むポックスウイルスの場合は、通常、反応はpHに非依存적であり、例えばニワトリ赤血球を用いて室温～37℃において反応が見られる。風疹ウイルスの場合は、例えばヒヨコまたはガチョウ赤血球を用い、4℃、pH約6.2または7.2などで反応させる。ポリオーマウイルスの場合は、例えばモルモット赤血球を用い、4℃、pH 7.2の条件を用いることができる。ラットウイルス（RV）の場合は、例えばモルモット赤血球で室温、pH7.2の条件が挙げられる。以上に挙げたようなHA活性を持つウイルス蛋白質またはその改変蛋白質を用いて、本発明の方法に従いウイルスを製造することが可能である。ここで改変蛋白質とは、天然の蛋白質の1つまたは複数のアミノ酸を欠失、置換、および/または挿入した蛋白質である。このような蛋白質であっても、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質であれば使用することができる。改変蛋白質は、もとの蛋白質の部分アミノ酸配列を含むことが好ましく、より好ましくはもとの蛋白質の8アミノ酸以上、より好ましくは9アミノ酸以上、より好ましくは10アミノ酸以上、より好ましくは15アミノ酸以上を含む。あるいは、改変蛋白質は、もとの蛋白質と好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上のアミノ酸配列の同一性を有する。改変蛋白質は、もとの蛋白質またはその部分蛋白質に、他の蛋白質が付加された蛋白質であってもよい。

ウイルスベクターのエンベロープに含まれるシアル酸結合活性を有する膜蛋白質

質の中でも、本発明の適用に特に好ましい蛋白質としては、具体的には、パラミクソウイルスのHN蛋白質、オルソミクソウイルスのHA蛋白質、トガウイルスのE1蛋白質、ワクシニアウイルスのA27L、H3L、D8L蛋白質、フラビウイルスのM、E蛋白質、コロナウイルスのE1、E2蛋白質、ブニヤウイルスのG1蛋白質などが挙げられる。特に、一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスが有するエンベロープ蛋白質が好ましく、特にオルソミクソウイルスのHA蛋白質が好ましい。

「一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルス」とは、一本鎖ネガティブ鎖〔すなわち(-)鎖〕RNAをゲノムに有するウイルスを言う。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス (Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含む)、ラブドウイルス (Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む)、フィロウイルス (Firoviridae)、オルトミクソウイルス (Orthomyxoviridae; Influenza virus A, B, C, および Thogoto-like viruses 等を含む)、ブニヤウイルス (Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, および Phlebovirus属等を含む)、アレナウイルス (Arenaviridae) などの科に属するウイルスが含まれる。特に好ましくは、オルトミクソウイルス科ウイルスのHA蛋白質が挙げられ、最も好ましくは、インフルエンザウイルスのHA蛋白質が挙げられる。また、例えばセンダイウイルス、狂犬病ウイルス、あるいは麻疹ウイルスのHN (またはH) 蛋白質なども好適である。これらの蛋白質は、複数を組み合わせて使用してもよい。これらの蛋白質は、ウイルスの天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。これらの蛋白質は、天然の蛋白質から改変された蛋白質であってもよい。

シアル酸結合活性を有する膜蛋白質は、シアル酸に結合する以外の活性を持つものであってもよい。例えば、パラミクソウイルスのHN蛋白質には、シアル酸結合活性 (HA活性) 以外にノイラミニダーゼ (NA) 活性も有している。HN蛋白質が持つノイラミニダーゼ活性は、それ自体がウイルス産生を促進する働きを持ちう

るが、本発明の方法に従ってグラム陽性菌由来NAを併用することにより、より効率的にウイルス産生を行うことが可能となる。また、本発明においてシアル酸結合活性を有する膜蛋白質を2種またはそれ以上用いてもよい。例えば、オルトミクソウイルスのHA蛋白質とパラミクソウイルスHN蛋白質の2種の蛋白質でシュードタイプ化したウイルスの製造において、本発明の方法を用いることができる。HN蛋白質がもつNA活性とグラム陽性菌由来のNAにより、さらに高い効率でウイルスを細胞から放出させることが可能となる。

本発明におけるウイルスベクターの製造は、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質を持つウイルスベクターの製造工程において、該ウイルスベクター産生細胞をグラム陽性菌由来ノイラミニダーゼの存在下で培養することにより行われる。すなわち、グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを含む培養液中でウイルス産生細胞を培養する。その後、産生されたウイルスを回収する工程により、細胞から産生されたウイルスを得ることができる。ウイルスの回収は、例えばウイルス産生細胞の培養上清を回収する工程であってよい。また、培養上清からさらにウイルスを回収する工程を含んでもよい。培養上清から、遠心、吸着、濾過等により、さらにウイルスを精製または濃縮することができる。

ノイラミニダーゼ (NA) (EC 3.2.1.18) とはシアル酸のグリコシド結合を切断する活性 (これをNA活性という) を有する蛋白質を言い、具体的には細胞膜上の糖蛋白質または糖脂質中のシアル酸のグリコシド結合を切断する活性を有する蛋白質である (Schauer, R., Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 40 (1982) 131-234 ; Cabezas, J.A., Biochem. J. 278 (1991) 311-312) 。ノイラミニダーゼの活性は、N-Acetylneuraminylactose (NANA-lactose) または牛顎下腺ムチン (Bovine submaxillary mucin) を基質として、pH 5.0、37℃において1分間に1 μ molのN-Acetylneuraminic acid (NANA) を生成するに要する酵素量を1 unit (U) として定義される (Cassidy, J.T. et al., J. Biol. Chem. 240: 3501 (1965)) 。NAは、シアリダーゼ (sialidase) と呼ばれることもある。

グラム陽性菌由来NAとは、グラム陽性菌が持つNAまたはその構造的同等物、あるいはそれらの改変体を言う。例えばグラム陽性菌由来NAには、グラム陽性菌から得ることができるNAが含まれる。例えば、グラム陽性菌培養物から精製されたNA、およびその組み換え体が含まれる。グラム陽性菌由来NAの組み換え体は、グラム陽性菌由来NAをコードする遺伝子を同種あるいは異種の生物中で発現させることにより製造することができる。グラム陽性菌から得ることができるNAは、他の原料から得たものであっても、グラム陽性菌から得られたNAと同等の蛋白質であれば、グラム陽性菌由来NAに含まれる。またグラム陽性菌由来NAには、野生型グラム陽性菌NAの1つまたは複数のアミノ酸を欠失、置換、および/または挿入することにより改変した蛋白質であって活性を持つ蛋白質が含まれる。改変されるアミノ酸数はNA活性を持つ限り制限されないが、好ましくは70アミノ酸以内であり、より好ましくは50アミノ酸以内であり、より好ましくは30アミノ酸以内であり、より好ましくは20アミノ酸以内であり、より好ましくは10アミノ酸以内であり、より好ましくは5アミノ酸以内であり、より好ましくは3アミノ酸以内である。改変されたNAは、グラム陽性菌野生型NAのアミノ酸配列と50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の同一性を有する。アミノ酸配列の同一性は、例えば、KarlinおよびAltschulによるアルゴリズムBLAST (Karlin, S. and Altschul, S.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。BLASTプログラムを用いる場合には、デフォルトパラメーターを用いるとよい。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) のウェブサイトを参照)。例えば2つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム (Tatiana A et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) により、2配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチ

と同様に扱い、例えば野生型グラム陽性菌NAのアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算すればよい。アミノ酸の改変に当たっては、NA活性に重要なBNR (bacterial neuraminidase repeat; Pfam Accession number PF02012 (Aspボックスとも呼ばれる)) を破壊しないよう、他の領域のアミノ酸を改変することが好ましい (Roggentin P. et al., Glycoconj. J. 6:349-353, 1989; Copley, R.R. et al., Protein Sci. 10:285-292, 2001)。BNRは複数コピーが互いに40アミノ酸残基以上離れて繰り返すことが好ましい。野生型NAのN末端および/またはC末端のアミノ酸は、改変しても活性に最小限の影響しか及ぼさないと考えられる。

グラム陽性菌由来NAには、例えば、野生型グラム陽性菌NAの部分蛋白質であって、NA活性を有する蛋白質が含まれる。部分蛋白質は、好ましくは野生型グラム陽性菌NAの全アミノ酸配列の連続した60%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは75%以上、より好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上を含む。またグラム陽性菌由来NAには、野生型グラム陽性菌NAまたはその部分蛋白質に、他の蛋白質が付加された蛋白質であって、NA活性を有する蛋白質が含まれる。活性を維持したまま、部分長の蛋白質あるいは他の蛋白質との融合蛋白質を作製することは、当業者が通常行っている。

グラム陽性菌とは、グラム染色 (Gram stain) に陽性の細菌およびその他の菌類を言う。グラム染色とは、一般に、塩基性染色液 (例えばクリスタルバイオレットなど) で染色し、ついでルゴール液 (I_2 -KI液) で処理してから極性溶媒 (アルコールまたはアセトンなど) で短時間洗浄した時に脱色抵抗性を示す菌を言う。洗浄後の対比染色 (例えばサフラニン液または希釈カルボールフクシン液) により、グラム陰性菌は赤色に染まるがグラム陽性菌は紫色を呈する。グラム陽性菌は、一般に比較的厚い (15~80nm) 細胞壁を持ち、多くは外層にリポ多糖を欠く。またリソチームに感受性が高いものが多い。具体的には、グラム陽性菌にはブドウ球菌、連鎖球菌、枯草菌、巨大菌、および放線菌などが含まれる。本発明においてグラム陽性菌由来NAは、好ましくは放線菌由来NAである。

放線菌とは、放線菌目 (Actinomysetales) 細菌およびその他の放線細菌 (Actinobacteria) を言う。放線菌はグラム陽性細菌のグループに属する。放線菌目には、フランキア科 (Frankiaceae)、マイクロモノスポラ科 (Micromonosporaceae)、プロピオニバクトリウム科 (Propionibacteriaceae)、シウドノカルジア科 (Pseudonocardiaceae)、ストレプトミセス科 (Streptomycetaceae)、ストレプトスポランギウム科 (Streptosporangiaceae)、テルモモノスポラ科 (Thermomonosporaceae)、コリネバクテリウム科 (Corynebacteriaceae)、マイコバクテリウム科 (Mycobacteriaceae)、ノカルジア科 (Nocardioideae)、アクチノミセス科 (Actinomycetaceae)、マイクロコッカス科 (Micrococcaceae)、Actinosynnemataceae科、Nocardiopsaceae科、および Glycomycetaceae科 などが含まれる。例えば、Actinomyces属NAは、Accession Number L06898 (protein: AAA21932、A49227)、X62276 (protein: CAA44166) (Actinomyces viscosusのNA) を参照のこと。Corynebacterium属NAは、例えば Accession Number NC_003450 (protein: NP_600771)、AP005278 (protein BAB98949) (Corynebacterium glutamicumのNA) を参照のこと。Streptomyces属NAは、例えば Accession Number NC_003155 (protein: NP_823018) (Streptomyces avermitilis)、NC_003888 (protein: NP_630638) (Streptomyces coelicolor) を参照のこと。

本発明において用いられるノイラミニダーゼは、好ましくは放線菌目細菌由来、より好ましくはマイクロモノスポラ科細菌由来、より好ましくは、マイクロモノスポラ属細菌由来のNAである。マイクロモノスポラ属細菌としては、*M. aurantiaca*、*M. brunnea*、*M. brunnescens*、*M. carbonacea*、*M. cellulolyticum*、*M. chalybeata*、*M. chersinia*、*M. citrea*、*M. coerulea*、*M. echinoaurantiaca*、*M. echinobrunnea*、*M. echinospora*、*M. floridensis*、*M. fulviviridis*、*M. fulvopurpureus*、*M. fulvoviolaceus*、*M. globosa*、*M. griseorubida*、*M. halophytica*、*M. inositol*、*M. inyoensis*、*M. lacustris*、*M. megalomicea*、*M. melanospora*、*M. narashino*、*M. olivasterospora*、*M. peucetica*、*M. purpurea*、*M. purpureochromog*

enes, *M. rhodorangea*, *M. rosaria*, *M. rosea*, *M. sagamiensis*, *M. viridifaciens*, *M. yulongensis*, *M. zionensis* などが挙げられるが、これらに制限されない。特に好ましいNAとしては、*M. viridifaciens* (ATCC 31146) 由来のNAが挙げられる。*M. viridifaciens*のNA遺伝子 (*nedA*) の塩基配列は Accession Number D01045 (配列番号:1) に、コードされる蛋白質のアミノ酸配列は Q02834 (配列番号:2) に記載されている (Sakurada, K. et al., J. Bacteriol. 174(21):6896-903, 1992)。

また、*M. viridifaciens*のNA遺伝子をプローブに、他のマイクロモノスポラのNA遺伝子を単離することができる。例えば、配列番号:1に記載の配列および/またはその相補配列の30塩基以上、より好ましくは50塩基以上、より好ましくは100塩基以上、より好ましくは150塩基以上、より好ましくは全長と、ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする核酸を選択すればよい。ハイブリダイゼーションにおいては、配列番号:1の配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジेंटなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5xSSC (1xSSCは 150 mM 塩化ナトリウムおよび 15 mM クエン酸ナトリウムを含む)、7%(w/v) SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、100 μ g/ml 変性サケ精子DNA、5xデンハルト液 (1xデンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、および0.2%フィコールを含む) を含む溶液中、48℃、好ましくは50℃、より好ましくは55℃、より好ましくは60℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度で2xSSC, 0.1% (w/v) SDS中、振盪しながら2時間洗浄する条件である。より好ましくは、洗浄は 1xSSC, 0.1% (w/v) SDS中で、より好ましくは0.5xSSC, 0.1% (w/v) SDS中で、より好ましくは0.1xSSC, 0.1% (w/v) SDS中で、振盪しながら2時間行う。

本発明のウイルスの製造方法においては、上記のようなグラム陽性菌由来NAの存在下でウイルスの産生細胞を培養し、産生されたウイルスを回収する。ウイル

スは細胞から培養液中に放出されるので、培養上清を回収することによりウイルスを回収することができる。シアル酸結合蛋白質によりシュードタイプ化したウイルスの製造であれば、該蛋白質を発現する細胞においてウイルスの産生させる際に、該細胞をグラム陽性菌由来NAの存在下で培養し、産生されたウイルスを回収する。グラム陽性菌由来NAは、NAを培養液中に添加して供給してもよいし、NAを発現するベクターを用いてウイルス産生細胞またはウイルス産生細胞と共培養する細胞などから該NAを分泌させてもよい。NAは、ウイルス産生細胞の培養期間の少なくとも一部の期間存在している。NAの存在下でウイルス産生細胞を培養する時間は、例えば1時間以上、好ましくは3時間以上、より好ましくは5時間以上、より好ましくは10時間以上、より好ましくは20時間以上である。好ましくは、ウイルス産生細胞の培養物から産生されたウイルスを回収する前に1時間以上、好ましくは3時間以上、より好ましくは5時間以上、より好ましくは10時間以上、より好ましくは20時間以上、グラム陽性菌由来NAの存在下でウイルス産生細胞を培養する。この間に培養上清中にウイルスが蓄積する。

グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼの存在量は、ウイルス産生量を最大化させるように適宜調整することができる。培養液中のグラム陽性菌由来NAの濃度は、例えば、0.1 mU/ml ~ 1000 U/ml であり、好ましくは 0.2 mU/ml ~ 500 U/ml であり、より好ましくは 0.5 mU/ml ~ 100 U/ml であり、より好ましくは 1 mU/ml ~ 50 U/ml である。特に、グラム陽性菌由来NAは 10 U/ml以下でも十分な力価のウイルスを製造することが可能であり、例えば 1 U/ml 以下、0.1 U/ml 以下、0.05 U/ml以下、あるいは0.01 U/ml以下といった低用量でも高い力価のウイルスをウイルス産生細胞から放出させることができる点で優れている。

本発明の方法を用いて製造されるウイルスベクターは、例えば上記のシアル酸結合膜蛋白質以外にさらに別の蛋白質をエンベロープに含んでいてもよい。例えば、ネガティブ鎖RNAウイルスのHA（またはHN）蛋白質などのヘマグルチニン活性を有するエンベロープ蛋白質に加えて、ネガティブ鎖RNAウイルスのF蛋白質など

の膜融合に関わるエンベロープ蛋白質をさらに含むことができる。また、所望のウイルス由来のエンベロープ蛋白質をさらに含むことができる。例えばヒト細胞に感染するウイルスに由来するエンベロープ蛋白質が好適に用いられる。このような蛋白質としては、特に制限はないが、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質、水疱性口内炎ウイルス（VSV）のG蛋白質などが挙げられる。また、ヘルペスウイルス科の蛋白質としては、例えば単純ヘルペスウイルスのgB、gD、gH、gp85蛋白質、EBウイルスのgp350、gp220蛋白質などが挙げられる。ヘパドナウイルス科の蛋白質としては、B型肝炎ウイルスのS蛋白質などが挙げられる。

例えば、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ（アンフォトロピックenv）蛋白質、およびネガティブ鎖RNAウイルスのHA（またはHN）蛋白質を含むベクターを、本発明の方法に従って製造することができる。また、本発明の方法により製造されるウイルスは、例えば水疱性口内炎ウイルス（Vesicular stomatitis virus; VSV）の表面糖蛋白質であるVSV-G蛋白質を含むことができる。VSV-Gはほとんどの動物細胞に存在するリン脂質をレセプターとしていると考えられており、VSV-G蛋白質およびシアル酸結合蛋白質を含むベクターを用いることにより、遺伝子導入できる細胞種が飛躍的に増え、導入効率も上昇する（W001/92508）。例えば、VSV-G蛋白質およびネガティブ鎖RNAウイルスのHA（またはHN）蛋白質を含むベクターが例示できる。これらのベクターは、さらにネガティブ鎖RNAウイルスのF蛋白質を含むことができる。すなわち、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質、F蛋白質、およびHA（またはHN）蛋白質を含むベクター、並びにVSV-G蛋白質、F蛋白質、およびHA（またはHN）蛋白質を含むベクターの製造において本発明は有用である。さらに、これらのベクターは、ネガティブ鎖RNAウイルスのM蛋白質を含むことができる。本発明は、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質、F蛋白質、HA（またはHN）蛋白質、およびM蛋白質を含むベクター、並びにVSV-G蛋白質、F蛋白質、HA（またはHN）蛋白質、およ

びM蛋白質を含むベクターの製造において好適に適用することができる。上記のようなベクターは、粘液を有する細胞や造血幹細胞を含む細胞分画など、従来では遺伝子の導入が困難であった細胞に対しても高い遺伝子導入能を示す点でも優れている。また、VSV-G蛋白質は1種類の糖蛋白が安定な3量体を形成して膜上に存在するため、精製過程でのベクター粒子の破壊が起こりにくく、遠心による高濃度の濃縮が可能となる (Yang, Y. et al., Hum Gene Ther: Sep, 6(9), 1203-13, 1995)。

ベクターのシュードタイプ化のために用いるネガティブ鎖RNAウイルスのHA (またはHN)、F、およびM蛋白質としては特に制限はない。特に、オルトミクソウイルス科、およびパラミクソウイルス科ウイルスの蛋白質は好適である。具体的には、例えば、インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスのエンベロープ蛋白質は好適に用いられ得る。例えば、ウイルス産生細胞においてインフルエンザウイルスのHA蛋白質を発現させて製造されたHAシュードタイプウイルスは、ヒト細胞を含めた広い哺乳動物細胞に感染可能である。ネガティブ鎖RNAウイルスのHA (またはHN)、F、およびM蛋白質等は、所望の株由来の蛋白質を用いることができ、例えば病原性ウイルスの蛋白質においては、強毒株または弱毒株由来の蛋白質であってよい。例えばセンダイウイルスのHN、F、およびM蛋白質としては、例えばZ株由来の蛋白質を用いることができる。インフルエンザウイルスエンベロープ蛋白質としても、所望の単離株由来のものが用いられ得る。

また、レトロウイルスのアンフォトロピックエンベロープ蛋白質としては、例えばマウス白血病ウイルス (MuLV) 4070A株由来のエンベロープ蛋白質を用い得る。また、MuLV 10A1由来のエンベロープ蛋白質を用いることもできる (例えばpCL-10A1 (Imgenex) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)))。エコトロピックエンベロープ蛋白質としては、例えばモロニーマウス白血病ウイルス (MoMuLV) 由来のエンベロープ蛋白質を用いることができる。水疱性口内炎ウイルスG蛋白 (VSV-G) としては、例えば Indiana血清型株 (J. Virology 39: 5

19-528 (1981)) 由来の蛋白を用いることができる。これら以外にも、所望の株由来の蛋白質を用いることができる。

ネガティブ鎖RNAウイルスのHA (またはHN)、F、G、M、あるいはレトロウイルスエンベロープ蛋白質など、上記のエンベロープ蛋白質は、野生型ウイルスが持つインタクトな蛋白質であってもよいし、天然または人為的に変異が導入されていてもよい。例えば、細胞表面の抗原分子となりうるエンベロープ蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用して抗原提示能を弱めた蛋白質を用いてウイルスを作成することも可能である。

例えば、HA蛋白質またはHN蛋白質などのシアル酸結合活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質や、他のエンベロープ蛋白質の細胞質側領域を欠失、置換、および/または付加により改変した蛋白質を用いてウイルスベクターをシュードタイプ化することにより、より高い遺伝子導入能を有するベクターを製造することが可能である。本発明は、天然に存在するシアル酸結合活性を有する膜蛋白質の細胞質側領域の一部または全部が、置換、欠失、および/または付加により改変された蛋白質を含むシュードタイプウイルスベクターの製造方法に関する。具体的には、例えばネガティブ鎖RNAウイルスのHA (またはHN) 蛋白質および/またはF蛋白質の細胞質側領域を欠失させたり、他の膜蛋白質 (例えばレンチウイルスを含むレトロウイルスのエンベロープ蛋白質) の細胞質側領域で置換または付加した改変蛋白質は、感染効率の高いウイルスベクターを製造するために好適に用いられる。特にシアル酸結合活性を有するウイルスエンベロープ蛋白質の細胞質側領域が、置換、欠失、および/または付加により野生型から改変されている蛋白質を用いて、より感染効率の高いシュードタイプウイルスベクターを製造することができる。例えばレトロウイルスの製造であれば、細胞質側領域をレトロウイルスのエンベロープ蛋白質のそれに置換したり、あるいはレトロウイルスのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域を付加することが好適である。

具体的には、ネガティブ鎖RNAウイルスのHA (またはHN) 蛋白質の細胞質側領域

を、SIV等のレンチウイルスまたはレトロウイルスのエンベロープ蛋白の細胞質側領域に置換した蛋白質、およびネガティブ鎖RNAウイルスのHA（またはHN）蛋白質にレンチウイルス等のレトロウイルスのエンベロープ蛋白の細胞質側領域を付加した蛋白質などでレトロウイルスをシュードタイプ化することにより、ヒト細胞を含む広い細胞に高率で外来遺伝子を導入することが可能となる。欠失させる細胞質側領域の範囲、および付加されるレトロウイルスのエンベロープ蛋白の細胞質側領域の範囲は特に制限はなく、細胞質側領域の一部または全部を欠失、置換、および/または付加させることができる。

このようなウイルスベクターは、さらにネガティブ鎖RNAウイルスの改変されたF蛋白質を含むことができる。例えば、ネガティブ鎖RNAウイルスのF蛋白質の細胞質側領域を欠失させた蛋白質、および、このような欠失蛋白質にSIV等のレンチウイルスまたはレトロウイルスのエンベロープ蛋白の細胞質側領域を付加した蛋白質などが用いられ得る。具体的には、例えばF蛋白細胞質側領域のアミノ酸を欠失させた蛋白質を発現するプラスミドを構築する。欠失させる範囲は特に制限はなく、細胞質側領域の一部または全部を欠失させることができる。例えば0～数個のアミノ酸を残して細胞質側領域を欠失させたF蛋白質は、シュードタイプ化レトロウイルスの製造に好適と考えられる。これらの欠失型F蛋白質に、他のウイルスエンベロープ蛋白質（例えばレンチウイルスエンベロープ蛋白質）の細胞質側領域の一部または全部を付加することにより、F蛋白質の細胞質側領域を他のペプチドに置換した蛋白質をウイルスの製造に用いることができる。例えば、SIVのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域の5'側より11アミノ酸を付加した蛋白質などを例示することができる。このように本発明は、ネガティブ鎖RNAウイルスのF蛋白質であって、該蛋白質の天然型の細胞質側領域の一部または全部が、置換、欠失、および/または付加により改変されている蛋白質をさらに用いてシュードタイプ化ウイルスを製造する方法にも関する。特に本発明は、F蛋白質の細胞質側領域が、レンチウイルスを含むレトロウイルスのエンベロープ蛋白質の細胞質側領域の一部

または全部と置換されている蛋白質をさらに有しているシュードタイプ化ウイルスを製造する方法にも関する。

また、ウイルスエンベロープ蛋白質の細胞外領域を、細胞に接着する活性を持つ他の膜蛋白質、接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質、抗体またはその断片に置換したキメラ蛋白質などを用いて、広範な組織または特定の組織を標的として感染するベクターを作り出すこともできる。

本発明のウイルスの製造方法は、特にレトロウイルスベクターの製造に好適である。レトロウイルスとは、(+)センス鎖RNAをゲノムに持ち、逆転写酵素を有することを特徴とするウイルスで、標的細胞に感染すると、逆転写酵素により自身のRNAゲノムをDNAに変換して標的細胞の染色体にこのDNAを組み込むウイルスの総称である。レトロウイルスは野生型レトロウイルスの改変体であってもよく、ウイルス粒子中に含まれているRNAがレトロウイルスのゲノムRNAの少なくとも一部の配列を含んでおり、そのRNAが、ウイルス粒子形成の際に、レトロウイルスのウイルス蛋白質の働きにより、その配列に依存してウイルス粒子中に取り込まれてできる感染性ウイルス粒子であればよい。より具体的には、レトロウイルスのゲノムRNAには、ウイルス粒子への取り込みに必要なパッケージングシグナル配列が含まれている。両端にLTRを持ち、このシグナル配列を含むようなRNAを転写させることにより、レトロウイルスのウイルス蛋白質の存在下、このRNAを持つウイルス粒子が形成される。

本発明においてレトロウイルスベクターは、オンコウイルスに由来するものが含まれる。「オンコウイルス」とは、オンコウイルス亜科 (Oncovirus) に属するレトロウイルスを指す。オンコウイルスには、肉腫ウイルス、白血病ウイルス、および乳癌ウイルスなど、発癌に関連するレトロウイルスが含まれる。例えば、モロニーマウス白血病ウイルス (Moloney Murine Leukaemia Virus; MoMLV) は、もっとも初期に開発されたレトロウイルスベクターの1つであり、これまでに多くの改良がなされ広く用いられている。MoMLVをネガティブ鎖RNAウイルスのHA (

またはHN) 蛋白質などのシアル酸結合蛋白質でシュードタイプ化したウイルスベクターは本発明により好適に製造することができる。また、マウス幹細胞ウイルス (Murine Stem Cell Virus; MSCV) も、特に血球系・造血系細胞および胎児性幹細胞などに対する遺伝子導入のためのベクターとして好適に用いられる。例えばネガティブ鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を持つエンベロープ蛋白質等を用いてシュードタイプ化したMSCVを用いることにより、造血幹細胞を含む骨髓CD34陽性細胞に効率的に遺伝子を導入することができる。

また、本発明においてレトロウイルスベクターは、レンチウイルスに由来するものが含まれる。レンチウイルスとは、レンチウイルス亜科 (Lentivirus) に属するレトロウイルスを指す。レンチウイルスには、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV) (例えばHIV1またはHIV2)、サル免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus; SIV)、ネコ免疫不全ウイルス (FIV)、マエディ・ビスナウイルス、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ヤギ関節炎脳炎ウイルス (CAEV) などが含まれる。レトロウイルスベクターは、所望の株およびサブタイプに由来するものであってよい。例えば HIV-1としては、全てのメジャー (M) サブタイプ (AからJを含む)、Nおよび outlier (O) が含まれる (Hu, D. J. et al., JAMA 1996; 275: 210-216; Zhu, T. et al., Nature 1998, 5; 391(6667): 594-7; Simon, F. et al., Nat. Med. 1998, 4(9): 1032-7)。SIV単離株としては、SIVagm、SIVcpz、SIVmac、SIVmdn、SIVnm、SIVsyk等が例示できる。

レンチウイルスの利点の1つは、非分裂細胞に対しても感染し、宿主細胞の染色体へウイルスゲノムを組み込む性質を持つことである。これにはgagおよびvprにコードされている核移行シグナルやインテグラーゼが重要な働きをしているものと考えられている。この性質を利用し、レンチウイルスをベースとしたウイルスベクターを本発明に従って製造すれば、生体内組織の非分裂細胞、種々の組織の幹細胞のようにほとんど分裂しない細胞へも遺伝子を導入し、長期間の遺伝子発現が可能となるベクターを効率良く製造することができる。

レンチウイルスの中でもっとも早くベクター化の試みが行われたのはヒト免疫不全ウイルスHuman Immunodeficiency Virus (HIV) であり、本発明の方法においても好適に適用することができる。また、他にも、SIV、ネコ免疫不全ウイルスFeline Immunodeficiency Virus (FIV) (Poeschla, E. M. et al., Nature Medicine, 4(3), 354-7, 1998) やヤギ関節炎脳炎ウイルスCaprine Arthritis Encephalitis Virus (CAEV) (Mselli-Lakhal, L. et al., Arch. Virol., 143(4), 681-95, 1998)、ウマ伝染性貧血ウイルス (EIAV)、ウシ免疫不全ウイルス (BIV) をベースとしたベクターの開発が行われている。これらのベクターの製造に、本発明の方法を適用することも可能である。

サル免疫不全ウイルス (Simian Immunodeficiency Virus, SIV) はサルにおけるHIV類似ウイルスとして発見され、HIVとともにPrimates Lentivirusグループを形成している (井戸栄治, 速水正憲, サル免疫不全ウイルスの遺伝子と感染・病原性, 蛋白質 核酸 酵素: Vol. 39, No. 8, 1994)。このグループはさらに大きく4つのグループに分類され、1) ヒトにおいて後天性免疫不全症候群 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS) の原因となるHIV-1とチンパンジーより分離されたSIVcpzを含むHIV-1グループ、2) スーティーマンガベイ *Cercocebus atys* より分離されたSIVsmmとアカゲザル *Macaca mulatta* より分離されたSIVmac、およびヒトに対し低頻度ではあるが病原性を示すHIV-2 (Jaffar, S. et al., J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 16(5), 327-32, 1997) よりなるHIV-2グループ、3) アフリカミドリザル *Cercopithecus aethiops* から分離されたSIVagmに代表されるSIVagmグループ、4) マンドリル *Papio sphinx* から分離されたSIVmndに代表されるSIVmndグループからなっている。

このうち、SIVagmおよびSIVmndでは自然宿主における病原性の報告はなく (Ohta, Y. et al., Int. J. Cancer, 15, 41(1), 115-22, 1988; Miura, T. et al., J. Med. Primatol., 18(3-4), 255-9, 1989; 速水正憲, 日本臨床, 47, 1, 1989)、特に本実施例で用いたSIVagmの一種であるTYO-1株は自然宿主でも、カニクイ

ザル *Macaca fascicularis*、アカゲザル *Macaca mulatta* に対する実験感染でも病原性を示さないことが報告されている (Ali, M. et al, Gene Therapy, 1(6), :367-84, 1994; Honjo, S et al., J. Med. Primatol., 19(1), 9-20, 1990)。SIV agmのヒトに対する感染、発症については報告がなく、ヒトに対する病原性は知られていないが、一般に霊長類におけるレンチウイルスは種特異性が高く、自然宿主から他種に感染、発症した例は少なく、その発症も低頻度あるいは進行が遅いという傾向がある (Novembre, F. J. et al., J. Virol., 71(5), 4086-91, 1997)。従って、SIVagm、特にSIVagm TYO-1をベースとして作製したウイルスベクターは、HIV-1や他のレンチウイルスをベースとしたベクターと比べて安全性が高いと考えられ、本発明において製造されるウイルスとして好適である。

また、本発明においてレトロウイルスベクターは、スプーマウイルス (Spumavirus) に由来するものが含まれる。スプーマウイルスには、例えばフォーミーウイルス (Foamyvirus) が含まれる (DE4318387; W09607749; Virology (1995) 210, 1, 167-178; J. Virol. (1996) 70, 1, 217-22)。フォーミーウイルスに由来するベクターは、ヒト細胞への外来遺伝子導入、特に遺伝子治療および組換えワクチンの投与などに利用され得る。

本発明においてレトロウイルスベクターは、LTR (long terminal repeat) に改変を加えることもできる。LTRはレトロウイルスに特徴的な配列であり、ウイルスゲノムの両端に存在している。5' LTRはプロモーターとして働き、プロウイルスからのmRNAの転写を促す。したがって、ウイルスベクターに取り込ませるRNAを発現するベクター (本発明においてこれをジーントランスファーベクターと呼ぶ) の5' LTRのプロモーター活性をもつ部分を別の強力なプロモーターと置換すれば、ジーントランスファーベクターからのmRNA転写量が増大し、パッケージング効率が上昇、ベクター力価を上昇させることが期待できる。さらに、例えばレンチウイルスの場合、5' LTRはウイルス蛋白質tatによる転写活性の増強を受けることが知られており、5' LTRをtat蛋白質に依存しないプロモーターに置換することで

、ウイルスのパッケージングに必要なウイルス遺伝子を発現するベクター（本発明においてこれをパッケージングベクターと呼ぶ）からtatを削除することが可能となる。また、細胞に感染し細胞内に侵入したウイルスRNAは逆転写された後、両端のLTRを結合させた環状構造となり、結合部位とウイルスのインテグラーゼが共役して細胞の染色体内にインテグレートされる。プロウイルスから転写されるmRNAは5' LTR内の転写開始点より下流から 3' LTRのpolyA配列までであり、5' LTRのプロモーター部分はウイルス内にパッケージングされない。したがって、プロモーターを置換したとしても標的細胞の染色体に挿入される部分には変化が無い。以上のことから、5' LTRのプロモーターの置換は、より高力価で安全性の高いベクターを作成することにつながると考えられる。従って、ジーントランスファーベクターの5' 側プロモーターの置換を行い、パッケージングされるベクターの力価を上昇させることができる。

また、3' LTRの配列を部分的に削除し、標的細胞から全長のベクターmRNAが転写されることを防止するSelf Inactivating Vector (SINベクター)（自己不活性化型ベクター）の作成により、安全性を上昇させることも可能である。標的細胞の染色体に侵入したレンチウイルスのプロウイルスは、3' LTRのU3部分を5' 端に結合した形となる。したがってジーントランスファーベクターは、標的細胞の染色体では5' 端にU3が配置され、そこからジーントランスファーベクター全体のRNAが転写されることになる。仮に、標的細胞内にレンチウイルスあるいはその類似の蛋白質が存在した場合、ジーントランスファーベクターが再びパッケージングされ、他の細胞に再感染する可能性がある。また3' LTRのプロモーターにより、ウイルスゲノムの3' 側に位置する宿主由来の遺伝子が発現されてしまう可能性がある (Rosenberg, N., Jolicoeur, P., *Retroviral Pathogenesis. Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 475-585, 1997)。この現象はレトロウイルスベクターにおいてすでに問題とされ、回避の方法としてSINベクターが開発された (Yu, S. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 83(10), 3194-8,

1986)。ジーントランスファーベクター上の3' LTRのU3部分を欠失させることにより、標的細胞内では5' LTRや3' LTRのプロモーターが無くなるため、全長のRNAや宿主遺伝子の転写が起こらない。そして、内部プロモーターからの目的遺伝子の転写のみが行われることになり、安全性が高く、高発現のベクターとなることが期待される。このようなベクターも、本発明の方法に従って製造することが可能である。SINベクター製造のためのジーントランスファーベクターの構築は公知の方法に従えばよい (W001/92508)。

レトロウイルスの産生には、宿主細胞でパッケージングシグナルを有するジーントランスファーベクターDNAを転写させ、gag, pol蛋白質およびエンベロープ蛋白質の存在下でウイルス粒子を形成させる。ジーントランスファーベクターDNAは、プラスミドのようなDNAベクターであってもよく、あるいはパッケージング細胞の染色体DNAに組み込まれていてもよい。ジーントランスファーベクターDNAにコードされるパッケージングシグナル配列は、この配列により形成される構造を保持できるように可能な限り長く組み込むことが好ましい一方で、該ベクターDNA上のパッケージングシグナルと、gag, pol蛋白質を供給するパッケージングベクターとの間で起こる組み換えによる野生型ウイルスの出現頻度を抑制するためにはこれらベクター間の配列の重複を最小限にする必要がある。従って、ジーントランスファーベクターDNAの構築においては、パッケージング効率および安全性の両者を満足させるために、パッケージングに必要な配列を含むできる限り短い配列を用いることが好ましい。

パッケージングシグナルとしては、パッケージングベクターが導入された細胞によりパッケージングされる限り制限はなく、パッケージングベクターの種類に合わせて、レトロウイルス由来、レンチウイルス由来、免疫不全ウイルス由来のシグナル配列などが用いられる。

例えば、SIVagm由来のパッケージングベクターの場合は、HIVベクターはパッケージングされないため、用いられるシグナル配列の由来としてはSIVのみに制限さ

れると考えられる。但し、HIV由来のパッケージングベクターを用いた場合、SIV由来のジーントランスファーベクターもパッケージングされるので、組換えウイルスの出現頻度を低下させるために、異なるレンチウイルス由来のジーントランスファーベクターとパッケージングベクターとを組み合わせるベクター粒子を形成させることが可能であると考えられる。この場合、霊長類のレンチウイルスの間の組み合わせ（例えば、HIVとSIV）であることが好ましい。

ジーントランスファーベクターDNAでは、gagタンパク質が発現しないように改変されていることが好ましい。ウイルスgagタンパク質は、生体にとって異物として認識され、抗原性が現れる可能性がある。また、細胞の機能に影響を及ぼす可能性もある。gagタンパク質を発現しないようにするためには、gagの開始コドンの下流に塩基の付加や欠失等によりフレームシフトするように改変することができる。また、gagタンパク質のコード領域の一部を欠失させることが好ましい。一般にウイルスのパッケージングには、gagタンパク質のコード領域の5'側が必要であるとされている。従って、ジーントランスファーベクターにおいては、gagタンパク質コード領域のC末側を欠失していることが好ましい。パッケージング効率に大きな影響を与えない範囲でできるだけ広いgagコード領域を欠失させることが好ましい。また、gagタンパク質の開始コドン（ATG）をATG以外のコドンに置換することも好ましい。置換するコドンは、パッケージング効率に対する影響が少ないものを適宜選択する。これにより構築されたパッケージングシグナルを有するジーントランスファーベクターDNAを、適当なパッケージング細胞に導入することにより、ジーントランスファーベクターDNAの転写産物を取りこまれたウイルスベクターを生産させることができる。生産させたウイルスベクターは、パッケージング細胞の培養上清等から回収することができる。

パッケージング細胞に使われる細胞としては、一般的にウイルスの産生に使用される細胞株であれば制限はない。ヒトの遺伝子治療用に用いることを考えると、細胞の由来としてはヒトまたはサルが適当であると考えられる。パッケージン

グ細胞として使用されうるヒト細胞株としては、例えば293細胞、293T細胞、293EBNA細胞、SW480細胞、u87MG細胞、HOS細胞、C8166細胞、MT-4細胞、Molt-4細胞、HeLa細胞、HT1080細胞、TE671細胞などが挙げられる。サル由来細胞株としては、例えば、COS1細胞、COS7細胞、CV-1細胞、BMT10細胞などが挙げられる。また、既存のパッケージング細胞を用いることも可能である。パッケージング細胞としては、例えばBosc23細胞、PE501細胞などが挙げられる。

ベクターが保持する外来遺伝子としては特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸であってもよく、また、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。

近年、遺伝子治療の標的として造血幹細胞をはじめとする各種の幹細胞が注目されている（花園豊，Molecular Medicine, Vol.36, No.7, 1999）。ネガティブ鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を持つエンベロープ蛋白質を持つシュードタイプレトロウイルスベクターは、ヒト骨髓由来CD34陽性細胞に対し高い効率で遺伝子を導入することができる（W001/92508）が、このCD34陽性細胞は造血幹細胞を含む分画として近年注目されている。CD34陽性細胞は、メチルセルロースを含む培地を用いたコロニーアッセイにおいて多分化能を持つこと（Kirshenbaum, A. S. et al., J. Immunol., 148(3), 772-7, 1992）や、複合免疫不全系統であるNOD / SCIDマウスにCD34陽性細胞を移植するとマウス骨髓に生着し造血系の再建が認められること（Larochelle, A. et al., Nat. Med., 2(12), 1329-37, 1996）が報告されており、少なくともCD34陽性細胞分画中に非常に未熟で幹細胞に近い状態の細胞が存在すると考えられている。また、CD34陽性細胞中の造血幹細胞は非分裂状態であり、一般にレトロウイルスベクターでは遺伝子導入効率が低い（Kiem, H. P. et al., Curr. Opin. Oncol., 7(2), 107-14, 1995）、ネガティブ鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を持つエンベロープ蛋白質を持つシュードタイプ化ベクターにより感染効率を大幅に改善することが可能であると考えられる。特に、HIVやSIVベクターなどのレンチウイルスベクターを用いれば、非分裂

細胞に対する遺伝子導入効率はさらに上昇することが期待される。本発明のシアル酸結合活性を持つ蛋白質でシュードタイプ化されたレトロウイルスベクターの製造方法は、血球系または造血系細胞への遺伝子導入のためのベクターの製造において有用である。本発明は、本発明のウイルスの製造方法により、血球系または造血系細胞への遺伝子導入用ベクターを製造する方法に関する。また本発明は、本発明の方法で製造されたベクターを血球系または造血系細胞に接触させる工程を含む、血球系または造血系細胞へ遺伝子を導入する方法、および血球系または造血系細胞への遺伝子導入のための、本発明の方法で製造されたベクターの使用に関する。血球系および造血系細胞に対する外来遺伝子導入の評価は、例えば既知の様々な表面抗原に対する抗体を用いたフローサイトメーターによる解析やコロニーアッセイ、造血系を破壊したマウスなどに造血細胞を移植して行う造血系再構築などにより検証することが可能である。

シアル酸結合活性を持つ蛋白質によりシュードタイプ化されたレトロウイルスベクターは、血球系細胞および造血系細胞に対する高率な遺伝子導入が可能であるので、ADA欠損症 (Blaese, R. M., *Pediatr. Res.*, 33(1 Suppl), S49-53, 1993)、血友病 (Kay, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96(18), 9973-5, 1999)、および Fanconi貧血症などの血液細胞を対象とした遺伝子治療において有用である。投与は例えばエキスピボ法により行うことができる。

具体的には、本発明の方法で製造されるベクターが適用可能な造血細胞系を対象とした遺伝子治療としては、例えば、腫瘍を化学抗癌剤治療するときの幹細胞の保護を目的とした薬剤耐性遺伝子MDR1の利用 (Licht, T. et al., *Gene Ther.* (2000) 7, 4, 348-58)、ファンコーニ貧血症のための正常FANCC遺伝子の導入 (Liu, J. M. et al., *Hum. Gene Ther.* (1999) 10, 14, 2337-46)、エキスピボ幹細胞増殖を補助するためのサイトカインの組み合わせ (トロンボポエチン、インターロイキン6および11、並びに Flt-3リガンド) の導入 (W099/07831)、血球減少症を治療するための Flt-3アゴニストなどのキメラ蛋白質の発現 (W098/46750

)、 β セラムアを治療するためのヒト β グロビン遺伝子の導入 (W09741141)、IL-6依存的な多発性骨髄腫治療のためのIL-6アンタゴニストと自殺遺伝子の発現の組み合わせ治療 (独国特許 DE19704979)、造血因子の組み合わせによる受容体アゴニスト [インターロイキン (GM-CSF, G-CSF-Ser17, M-CSF, エリスロポエチン, IL-1, IL-14, IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15)、白血病抑制因子 (LIF)、flt3/flk2リガンド、ヒトソマトトロピン、B細胞増殖因子、B細胞分化因子、赤血球分化因子 (EDF)、または幹細胞因子 (SCF)] (W097/12985)、幹細胞培養および造血疾患の遺伝子治療に用いられるc-mpl受容体アゴニスト (W097/12978)、ヒト造血始原細胞の増殖に用いられるIL-6およびIL-6可溶性受容体の融合蛋白質 (Nat. Biotechnol. (1997) 15, 2, 142-45)、造血始原細胞の増殖に用いられるIL-6スーパーアゴニストおよびスーパーアンタゴニスト (W096/18648)、血液疾患の治療に用いられるFactor-X (J. Cell. Bioche. (1995) Suppl. 21A, 410)、ヒト造血始原細胞の増殖に用いられる幹細胞因子、IL-6、および可溶性IL-6受容体複合体 (Gene Ther. (1995) 2, 9, 694)、RNAウイルスを標的とするリボザイムおよびHIV感染防御および細胞内免疫に有用なアンチセンスおよび/またはRNAデコイ (W096/22368) などの遺伝子導入が挙げられる。本発明は、これらのいずれかまたはその組み合わせをコードするウイルスベクターであって、シアル酸結合膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターの製造方法に関する。

また本発明の方法で製造されるベクターは、鼻腔の粘膜上皮細胞および肺の気管支粘膜上皮細胞など、粘液を持つ細胞に対する感染能力が高い。気管上皮などの粘膜細胞は、従来のウイルスベクターでは遺伝子導入が困難であり、導入に際して物理的障害を取り除く処理がされており、例えばVSV-GシュードタイプHIVベクターを用いた遺伝子導入では二酸化硫黄などにより傷害しないと十分な導入効果が認められていない (L. G. Johnson et al., Gene Therapy, 7, 568-574, 2000)。本発明の方法で製造されるベクターは、従来では遺伝子導入が困難であった

粘液を持つ細胞に対して、細胞や組織を傷害することなく高い効率で遺伝子を導入することが可能である (W001/92508)。本発明は、本発明のウイルスの製造方法により、粘液を有する細胞への遺伝子導入ベクターを製造する方法に関する。また本発明は、本発明の方法で製造されたベクターを粘液を有する細胞に接触させる工程を含む、粘液を有する細胞へ遺伝子を導入する方法、および粘液を有する細胞への遺伝子導入のための、本発明の方法で製造されたベクターの使用に関する。粘液を有する細胞としては、特に粘膜上皮細胞、具体的には、例えば鼻腔または肺の気管支の粘膜上皮細胞などが挙げられる。

具体的な適用例としては、例えば、抗原提示細胞 (APC) の濃度が高いことを利点として応用した皮膚・粘膜への遺伝子 (IL-2, IFN- γ , TGF- β 等) 導入による免疫誘導 (W095/05853)、遺伝子の経口的粘膜投与によるロタウイルスワクチン (J. Virol. (1998) 72, 7, 5757-61)、自己免疫疾患を治療するための粘膜投与 (W09746253)、感染予防のための粘膜投与 (W096/21356)、性病またはパピローマウイルス感染による子宮頸癌を予防するための、女性性器粘膜への遺伝子投与 (Infect. Immun. (1998) 66, 1, 322-29)、粘膜投与による投与の容易性と安全性の向上 (Proc. Am. Assoc. Cancer Res. (1995) 36, 86 Meet., 418) などが挙げられる。

本発明における組み換えレトロウイルスベクターの製造方法は、具体的には、例えば、(a) レトロウイルスのゲノムRNAを転写し、かつgag蛋白質、pol蛋白質、およびシアル酸結合活性を有する膜蛋白質を発現する細胞 (ウイルス産生細胞) を提供する工程、および (b) グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼの存在下で該細胞を培養し、産生されたウイルスを回収する工程を含む方法である。レトロウイルスのゲノムRNAは、ウイルス粒子中にパッケージングされ、標的細胞の染色体に組み込まれる機能を有する限り、野生型ウイルスのゲノムから改変されていく、例えば両端にLTRを持ち、内部にパッケージングシグナル配列を含むRNAであってよい。ゲノムRNAには、所望の遺伝子を組み込むことができる。組み込ま

れた外来遺伝子は、LTRのプロモーター活性により発現させることもできるし、ゲノムの内部に他のプロモーターを組み込んでそのプロモーターから発現させてもよい。

ウイルス産生細胞で発現させるgagおよびpol蛋白質、およびゲノムRNAは、これらがアセンブルされてウイルスが形成される限り、異なるウイルスに由来するものであってもよい。例えば、HIV由来のウイルス蛋白質を発現するパッケージング細胞を用いて、SIVのゲノムRNAをパッケージングすることができる。このとき、パッケージング細胞にシアル酸結合活性を持つ膜蛋白質を一時的あるいは持続的に発現させる。グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼの存在下で上記のウイルス産生細胞を培養することにより、シアル酸結合活性を持つ膜蛋白質をエンベロープに持つレトロウイルスが培養液中に放出される。この培養物あるいは培養上清を回収することにより、産生されたウイルスを得ることができる。

例えば本発明におけるレトロウイルスベクターの製造は、次のように行うことができる。但し、以下に示すウイルスベクターの製造方法の具体例は一例であり、当業者であれば適宜変更することが可能である。

組み換えウイルスのシュードタイプ化に用いるウイルスエンベロープ蛋白質をプラスミドベクターを用いて発現させる場合には、例えば該蛋白質をコードする遺伝子をpCAGGS (Niwa, H. et al., Gene: 108, 193-200, 1991) 等に組み込んで発現ベクターを構築する。このベクターに、例えばネガティブ鎖RNAウイルス（インフルエンザウイルスまたはセンダイウイルスなど）のHA（またはHN）蛋白質、F蛋白質、M蛋白質をコードする遺伝子を組み込む。例えば、インフルエンザウイルス(H1N1)由来ヘマグルチニン蛋白(HA)発現プラスミドの構築であれば、プラスミドpDREF HisD (Microbiol. Immunol., 44(8), 677-685, 2000) をテンプレートとし、適当なプライマー対を用いたPCRによりHA蛋白質のORFを増幅する。増幅断片をNotIにより切断後、pCAGGSにXhoI-NotI部位を付加したベクターのNotI部位に組み込む。これにより、HA蛋白発現プラスミドpCAGGS-HA (W001/92508) が得られる

。また、センダイウイルスのエンベロープ蛋白質発現プラスミド等であれば、例えばセンダイウイルスZ株の全長ゲノムDNA pSeV18^b(+) (Hasan, M. K. et al., 1997, J. General Virology 78: 2813-2820) から切り出した F、HN、およびM蛋白質遺伝子をpCAGGSのXhoIサイトに導入することにより、センダイウイルス由来F、HNおよびM蛋白質発現ベクター（それぞれ pCAGGS F、pCAGGS HN、およびpCAGGS M と称す）（W001/92508）を作製することができる。

レトロウイルス産生であれば、ウイルス産生細胞としては、例えばヒト胎児腎細胞由来細胞株293T細胞 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, pp. 8392-8396, 1993) を用いることができる。293T細胞は、例えば10%非動化ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, GibcoBRL) で培養する。DNAベクターのトランスフェクションは、LIPOFECTAMINE PLUS (GibcoBRL) などを用いて添付説明書に従って行うことができる。一例を挙げれば、293T細胞を6ウェルのプラスチックプレートへ1ウェルあたり 1×10^6 個の細胞密度でまき、炭酸ガスインキュベーター中 (37℃、10%炭酸ガス存在下) で48時間培養する。トランスフェクションの30分前に培養液を1ウェルあたり800 μ lの1%ウシ血清アルブミン (GibcoBRL) を含むD-MEM (GibcoBRL) に培地交換し培養を続ける。

ジーントランスファーベクターとしては特に制限されないが、例えばマウス幹細胞ウイルス (Murine Stem Cell Virus; MSCV) (CLONTECH社製) (R. G. Hawley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10297-10302 (1996); R. G. Hawley et al., Gene Therapy 1: 136-138 (1994)) を用いることができる。ここに、発現させたい所望の遺伝子を組み込んで使用する。トランスフェクションに使用するDNA量は、例えば1ウェルあたり700ngのジーントランスファーベクターと、300ngのパッケージングベクター (pCL-Eco, pCL-Ampho (MuLV 4070A)、共にIMGENE X社) (Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)) とを使用し、それらに加えて200ngの上記ネガティブ鎖RNAウイルスのエンベロープ蛋白質発現ベクターを単独あるいは任意に組み合わせて使用することができる。DNAを100 μ l

のOptiMEMに溶解後に6 μ lのPLUS reagent (GibcoBRL)を加えて攪拌後15分室温で静置する。DNAとPLUS reagent (GibcoBRL)との混合液に、100 μ lのOptiMEMで希釈した4 μ lのLIPOFECTAMINEを添加して攪拌後さらに15分室温で静置する。以上の方法により調製したDNAとLIPOFECTAMINEとの複合体を含む溶液を6ウェルプレートで培養している293T細胞へ滴下してゆるやかに攪拌した後に炭酸ガスインキュベーター中(37°C, 10%炭酸ガス存在下)で3時間培養する。培養後1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミン (GibcoBRL)と15 μ g/mlの濃度のトリプシン (GibcoBRL)を含むDMEM (GibcoBRL)を添加し、炭酸ガスインキュベーター中(37°C, 10%炭酸ガス存在下)で24時間培養する。その後1ウェルあたり2 mlの1%ウシ血清アルブミン、5 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL)および0.01 unitのグラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを含むDMEMに培地交換し、24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μ mのポアサイズのフィルター (DISMIC-25CS フィルター、ADVANTECなど)で濾過してベクター溶液を得ることができる。グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼは、例えば放線菌由来NA、具体的には *M. viridifaciens* 由来NAを用いることができる。NAの用量は適宜調整することができる。ネガティブ鎖RNAウイルスのヘマグルチニン活性を持つエンベロープ蛋白質でシェードタイプ化したレトロウイルスは、肺の気管支粘膜上皮細胞など粘液を持つ細胞に対して高い感染能力を持つことから。このようにして製造されるベクターは、粘液を持つ細胞への遺伝子導入に有用である。また、このウイルスベクターは、ヒト骨髄CD34⁺細胞およびCD34⁻細胞の両方に遺伝子導入能を持っていることから、造血系細胞に対する遺伝子導入に有用である。

モロニーマウス肉腫ウイルス (Moloney murine sarcoma virus) をベースにしたシェードタイプレトロウイルスベクターも、本発明において好適に製造される。また、エンベロープ蛋白質としてVSV-Gをさらに含むベクターを作製することもできる。例えば、ジーントランスファーベクターとして、上記のpMSCV EGFP、またはモロニーマウス肉腫ウイルス (Moloney murine sarcoma virus) 由来のLTRの

制御下にlacZを発現するpLZRNL (Yee, J.-K. et al., Methods In Cell Biology, vol. 43, pp.99-112 (1994); Xu, L. et al., Virology 171, 331-341 (1989))を用いて、以下に示すように様々なエンベロープ蛋白質でシュードタイプ化したレトロウイルスベクターを作製することが可能である。

293T細胞（ヒト胎児腎臓由来細胞株）は、10%非働化仔ウシ血清（BIO WHITTAKER）を含むDMEM高グルコース（Gibco BRL）を用いて、37℃、10%CO₂で培養する。この293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり5×10⁵個でまき、37℃、10% CO₂で48時間カルチャーする。培養液を1ウェルあたり800μlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いる。1ウェルあたりジーントランスファーベクター（pMSCV EGFPまたはpLZRNL）700ngに加えて、VSV-G発現プラスミドpVSV-G（Indiana血清型株由来）（Clontech）100ng、ネガティブ鎖RNAウイルスのHA（またはHN）、F、およびM蛋白発現プラスミド（pCAGGS中）をそれぞれ200ng、並びにマウスレトロウイルス外殻蛋白発現プラスミドpCL-Eco、およびpCL-Ampho（Imgenex）（Naviaux, R. K. et al., J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)) 300ngを任意に組み合わせて、100μlのOpti MEMに溶解後、6μlのPLUS Reagent（Gibco BRL）を加えて攪拌、15分間室温で静置する。これに、100μlのOpti MEMで希釈した4μlのLIPOFECTAMINE Reagent（Gibco BRL）を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37℃、10% CO₂下で3時間カルチャーする。1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミンおよび15μg/mlのトリプシン（Gibco BRL）を含むDMEMを加え、37℃、10% CO₂で、24時間培養、その後1ウェルあたり2 mlの1%ウシ血清アルブミン、5μg/mlのトリプシン（Gibco BRL）および0.01 unitのグラム陽性菌（例えば放線菌）由来ノイラミニダーゼを含むDMEMに培地交換し、24時間培養後に培養上清を回収、0.45μmのフィルターで濾過してベクター溶液を得る。

また、本発明は特にレンチウイルスベクターの製造に好適に適用される。以下に、VSV-Gシュードタイプレンチウイルスベクターの製造方法の一例を示す。

ベクター系の構築には、例えば非病原性のアフリカミドリザル免疫不全ウイルスのクローンであるSIVagm TYO-1株を用いることができる。SIVagm TYO-1を組み込んだプラスミドとしては、例えばpSA212 (J. Virol., vol. 64, pp. 307-312, 1990) を材料にして構築することができる。ジーントランスファーベクターおよびパッケージングベクターの構築は、公知の文献を参照することができる (W001/92508) 。具体的には、ベクター粒子形成に必要な蛋白質を供給するため、gag、pol、tat、rev、vif、vpr / xの各配列をプロモーター下流に配置した発現プラスミド (パッケージングベクター) を構築する。野生型ウイルスの産生を回避するためパッケージングシグナル Ψ およびenvの大部分を除去することが好ましい。gag上流にSD配列、tat / revの第一エクソンの下流にRRE配列を挿入し、パッケージングベクター上のすべての遺伝子が発現しうるようにすることができる。さらに、ベクターのパッケージングに必須ではないと考えらるnefの全配列を除外することができる。

ベクター内にパッケージングされるRNAを供給するジーントランスファーベクターには、ゲノム両端のLTR配列、SD、 Ψ 、RREが組み込まれたものを構築する。さらに、ジーントランスファーベクターの5' LTRプロモーター領域を外来のプロモーターと置換してもよい。また、3' LTRの配列を部分的に削除し、標的細胞から全長のベクターmRNAが転写されることを防止するSelf Inactivating Vector (SINベクター) を作製し、プロモーターとして例えばCMVプロモーターを挿入し、その下流に所望の外來遺伝子を組み込む。

シュードタイプベクター粒子を形成するための外殼蛋白質供給ベクターとしてVSV-G発現ベクターを用いることができる。例えば、VSV-G供給ベクターとして、これまでにレトロウイルスベクター、HIVベクターのシュードタイプ化において実績のあるpVSV-Gを使用してもよい (Burns, J. C. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8033-8037) 。

以下にその詳細を記載する。

<パッケージングベクターの構築>

vifとtat / revの第1エクソンを含む領域(5337-5770)に相当するDNA断片を適当なプライマー対を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRにより得る。PCRプライマーに制限酵素部位であるEcoRI部位を付加することでDNA断片の3'端にEcoRI部位を持つ断片を調節する。PCR断片をBglIIとEcoRIにより切断した後、アガロースゲル電気泳動とWizard PCR Preps DNA Purification System (Promega)で精製する。以上のようにして得たDNA断片と、gag / pol領域をコードするDNA断片(XhoI (356) 部位からBglIII (5338) 部位まで)を、pBluescript KS+ (Stratagene)のXhoI-EcoRI部位へライゲーションする。次に、Rev responsive element (RRE)とtat / revの第2エクソンを含む領域(6964-7993)に相当するDNA断片をPCRで増幅する。テンプレートとしては、例えばpSA212を用い、PCRにより3'端にNotI部位を付加し、EcoRIとNotIで切断後に精製し、gag-tat / revを組み込んだpBluescript KS+のEcoRI-NotI部位へ組み込む。

スプライシングドナー (SD) 部位は、この配列を含むDNA断片を合成し、合成時に5'端にXhoI部位、3'端にSalI部位を付加し、上記のgag-RRE-tat / revを組み込んだpBluescript KS+のXhoI部位に組み込む。得られたプラスミドをXhoIとNotIにより切断し、SD-gag-RRE-tat / revを含む断片を精製する。pCAGGS (Gene, vol. 108, pp.193-200, 1991)のEcoRI部位にXhoI / NotIリンカーを組み込んだプラスミドを作製し、XhoI-NotI部位に上記のSD-gag-RRE-tat / rev断片を組み込む。以上の方法により得られたプラスミドをパッケージングベクターpCAGGS / SIVagm gag-tat / revとして使用する (W001/92508)。

<ジーントランスファーベクターの構築>

SIVagmTY01由来の5' LTR領域(8547-9053 + 1-982、5'端にKpnI部位、3'端にEcoRI部位を付加)、3' LTRを含む領域(8521-9170、5'端にNotI部位とBamHI部位、3'端にSacI部位を付加)、およびRRE配列(7380-7993、5'端にEcoRI部位、3'端にSacII部位を付加)を適当なプライマー対を用いて、pSA212をテンプレ-

トとしたPCRでそれぞれ増幅する。pEGFPN2 (Clontech) 由来のCMVプロモーター領域 (1-600、5' 端にSacII部位、3' 端にNotI部位を付加) を適当なプライマー対で増幅する。これらのDNA断片の末端を切断、精製後にpBluescript KS+ のKpnI-SacI部位に5' LTR→RRE→CMVプロモーター→3' LTRの順でライゲーションし組み込む。レポーター遺伝子として例えばpCMVβ (Clontech) 由来のβガラクトシダーゼ遺伝子を含むNotI断片をNotI部位へ組み込み、KpnI-SacIで切断して5' LTRから3' LTRまでを含むDNA断片を切り出し、pGL3 Controlベクター (Promega) のKpnI-SacI部位へ組み込み、ジーントランスファーベクターpGL3C / 5' LTR. U3G2 / RREc / s / CMV F β-gal / WT3' LTRとする。

また、pEGFPC2 (Clontech) 由来のCMVプロモーター領域とEGFPをコードする領域 (1-1330、5' 端にSacII部位、3' 端にNotI部位とBamHI部位と翻訳ストップコドン (1-1330、5' 端にSacII部位、3' 端にNotI部位とBamHI部位と翻訳ストップコドンを付加) を適当なプライマー対を用いてpEGFPC2をテンプレートとしたPCRにより増幅する。4種のPCR断片をそれぞれ制限酵素KpnIとEcoRI、EcoRIとSacII、BamHIとSacI、SacIIとBamHI切断した後に精製し、pBluescript KS+のKpnI-SacIの間に5' LTR→RRE→CMVプロモーターEGFP→3' LTRの順にライゲーションして組み込む (pBS / 5' LTR. U3G2 / RREc / s / CMVFEGFP / WT3' LTR)。プラスミドpBS / 5' LTR. U3G2 / RREc / s / CMVFEGFP / WT3' LTR をKpnI-SacIで切断して5' LTR-3' LTRを含むDNA断片を調製し、pGL3 Control (Promega) ベクターのKpnI-SacI部位へ組み込み、ベクター (pGL3C / 5' LTR. U3G2 / RREc / s / CMVFEGFP / WT3' LTR) を構築する。

<5' LTRの改変>

5' LTRのTATAボックスの下流からgag領域 (9039-9170 + 1-982) を含む断片を適当なプライマー対を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRで増幅する。サイトメガロウイルス由来のCMV Lプロモーター (pCI (Promega) 由来、1-721) をPCRにより増幅する。5' LTRのTATAボックス下流を含む断片と、プロモーターを含む断片とを混合し、これをテンプレートとして、プロモーターの5' 側プライマーとLTRの3' 側プライマーを用いてPCRを行い、プロモーターと5' LTRとのキメラプロモ

ーターのDNA断片を得る。得られたDNA断片をジーントランスファーベクター (pGL3C/5' LTR. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3' LTR) のKpnI-EcoRI部位に組み込む (pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3' LTR)。同様に、上記のPCRにより得られたDNA断片を、ベクターpGL3C/5' LTR. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTRのKpnI-EcoRI部位にも組み込む (pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTR)。

<3' LTRの改変; SIN (self inactivating vector) ベクターの作製>

3' LTRのU3領域 5' 側 27bp と 3' 側 15bp およびR領域を含むDNA断片を適当なプライマー対を用いてpSA212をテンプレートとしたPCRで増幅する。この断片を、前節で得られたキメラプロモーター導入ジーントランスファーベクターpGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3' LTRのSalI-SacI部位に組み込む (pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/3' LTR Δ U3)。同様に、この断片を pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3' LTRのSalI-SacI部位へも組み込む (pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTR Δ U3) (WO01/92508)。

構築したプラスミドは、定法に従いDH5 α (東洋紡) にトランスフォームし、寒天培地上で培養、出現したコロニーをテンプレートとして、PCR等により構造が正しいことを確認する。確認されたクローンについて、100mlのLB培地で培養し、QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製する。

<ウイルスベクター回収>

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり 5×10^5 個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーする。培養液を1ウェルあたり800 μ lのOpti MEM (HAを用いた場合は1%BSAを含む) に置換してトランスフェクションに用いる。1ウェルあたり上記のジーントランスファーベクター 600ngおよび上記のパッケージングベクター 300ngに加え、ネガティブ鎖RNAウイルスのHA (またはHN) およびF蛋白発現プラスミド (pCAGGS中) 100-300ng、VSV-G発現プラスミドpVSV-G (Clontech) 100ng 等のエンベロープ蛋白質発現プラスミドを任意に組み合わせて、100 μ lのOpti MEMに溶解後6 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加

えて攪拌、15分間室温で静置する。これに、4 μ lのLIPOFECTAMINE reagent (Gibco BRL) を加えた100 μ lのOpti MEMを添加し攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーする。1ウェルあたり1mlの20%非働化ウシ血清 (HAを用いた場合はウシ血清の代わりに1%BSAおよび5 μ g/mlのトリプシン) を含むD-MEMを加え、37°C、10% CO₂で12時間カルチャーした後に、1ウェルあたり2mlの10%非働化ウシ血清を含むD-MEMに培地交換し、(HAを用いた場合はウシ血清の代わりに1%BSAおよび5 μ g/mlのトリプシンを含むD-MEMにて *M. viridifaciens*由来NAの存在下で) 24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過したものを使用する。

<SIVagmベクターによる遺伝子導入>

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり5 \times 10⁵個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーする。カルチャーより培養液を除去し、ベクター液にポリブレン (Sigma) を最終濃度8 μ g / mlで添加したものを1ml重層し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーし、ベクターを感染させる。3時間後に培養液を1ml加え、1日後に培養液を交換する。さらに1日後に、 β -Gal発現ベクターの場合は、 β -Gal Staining Kit (Invitrogen) を用いてX-galを基質とした染色を行い、標的細胞での β ガラクトシダーゼの発現を光学顕微鏡による検鏡で確認する。EGFP発現ベクターの場合は、蛍光顕微鏡により解析する。

<ベクターの力価測定>

ベクターの力価測定は、ベクター液1mlによって遺伝子導入される細胞の数によって計算する。293T細胞を1 \times 10⁶ / plateで6ウェルカルチャープレートにまき、48-72時間カルチャーする。ここに、上記と同様の方法で段階的に希釈したベクター液を感染、感染後48時間後にX-gal染色を行う。光学顕微鏡で200倍の倍率で検鏡、例えば視野内の遺伝子導入細胞数を測定し、3視野の平均を求め、視野の面積とプレートの面積よりもとめた係数854.865をかけることにより力価の算出を行う。これにより算出されるウイルスベクターの力価の単位は Transducing Unit

(T.U.) / mlと定義される。

このようにして作製されるSIVagmベクターは、培養細胞および生体内外の細胞に対して高い遺伝子導入能を持つ。上記のような、ジーントランスファーベクター、パッケージングベクター、およびエンベロープ発現ベクターという複数種類の独立したプラスミドのコトランスフェクションによるベクターのパッケージングにおいては、野生型ウイルスの再構成の確率は極めて低いと考えられる。また、ベースであるSIVagmTYO-1は、自然感染および実験的な感染の両方において病原性を示さないことが確認されている (Ohta, Y. et al., *Int. J. Cancer* 41, 115-22, 1988; Miura, T. et al., *J. Med. Primatol.* 18(3-4), 255-9, 1989; Honjo, S. et al., *J. Med. Primatol.* 19(1), 9-20, 1990)。さらに、一般にレンチウイルスは種特異性が強く、他種の動物では病原性が低い傾向がある (Novembre, F. J. et al., *J. Virol.* 71(5), 4086-91, 1997) ことからベクターの安全性は高いものと考えられる。

このベクター産生系は、構築過程においてパッケージングベクター上からはパッケージングシグナル配列が削除されているため、ウイルス蛋白質をコードするRNAは粒子内にパッケージングされない。また、rev蛋白質はRREに結合し、RNAの細胞質への輸送やスプライシングの抑制などを行うことでウイルス蛋白質の発現、全長RNAのウイルス内への取り込みが行われるため、パッケージングベクターおよびジーントランスファーベクターの双方にRREを組み込んだことにより、パッケージングベクターのmRNAスプライシングが制御され、すべての遺伝子の発現が可能となると考えられる。さらに、ジーントランスファーベクターのmRNAが細胞質に運搬され、ベクター粒子内にパッケージングされると考えられる。vif、vpr / xについては、HIV-1ベクターでは除去している場合もあり (Dull, T. et al., *J. Virol.* 72(11), 8463-71, 1998)、ベクター粒子のパッケージングおよび機能にとって必須ではない可能性がある。vprは非分裂細胞に対する感染性の一因であるとも考えられており (Heinzinger, N. K. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S*

A 91(15), 7311-5, 1994)、HIV-1ベクターではvprの有無により遺伝子導入できる細胞が異なるという報告がある (Kim, V. N. et al., J. Virol. 72(1), 811-6, 1998)。上記においてパッケージングベクターから完全に除去したnefは、SIVによる免疫不全症を引き起こす原因の一つであることがサルを用いた感染実験で報告されている (von Gegerfelt, A. S. et al., J. Virol. 73, 6159-65, 1999; Kestler, H. W. 3d., Naidu, Y. N., Kodama, T., King, N. W., Daniel, M. D., Li, Y., Desrosiers, R. C. Use of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus for pathogenesis studies., J. Med. Primatol. 18(3-4): 305-9, 1989)。上記で構築したSIVagmベクターではこの配列を完全に除去しているため、仮にパッケージングベクター由来のウイルス遺伝子を含む再構成ウイルス粒子ができたとしても、病原性を持つ危険性がさらに低下していると考えられる。

レンチウイルスをベースとしたベクターは、ベースのウイルスが非分裂状態の細胞に対し感染性を持つことから、細胞周期を停止した培養細胞や神経細胞に対して遺伝子導入能を持つことが期待される (Naldini, L. et al., Science: 272 263-267, 1996; Sutton, R. E. et al., J. Virol., 73(5), 3649-60, 1999)。さらに、VSV-Gによるシュードタイプ化を行うことにより、感染指向性はベースであるSIVのようにCD4およびケモカインレセプター陽性細胞に限定されない。VSV-Gのレセプターはリン脂質の一種であるホスファチジルセリンであることが知られており、この分子はさまざまな細胞上に存在する (Schlegel, R. et al., Cell, 32(2), 639-46, 1983)。このためVSV-Gによってシュードタイプ化を行ったSIVagmベクターの感染指向性は非常に広い。このベクターを基にシアル酸結合活性を有する膜蛋白質によりシュードタイプ化されたウイルスを作製することにより、ほぼすべての動物細胞に高い効率で遺伝子導入が可能となると予想される。

ウイルスベクター作製の際のプラスミドベクターの細胞へのトランスフェクション量は、適宜調整することが可能である。例えば、これに制限されるものでは

ないが、次のような方法も例示できる。

1. 細胞培養

293T細胞（ヒト胎児腎臓由来細胞株）は、10%非働化仔ウシ血清（BIO WHITTAKER）を含むDMEM高グルコース（Gibco BRL）を用いて、37℃、10%CO₂で培養する。

2. ベクターの作製

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり5×10⁵個でまき、37℃、10% CO₂で48時間カルチャーする。培養液を1ウェルあたり800 μlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いる。1ウェルあたりジーントランスファベクター（pGL3C/CMV. U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTR ΔU3 または pGL3C/CMV. U3G2/RREc/s/CMVF β-gal/3LTR ΔU3）1200ng、パッケージングベクター（pCAGGS / SIVagm gag-tat / rev）360ngに加え、エンベロープ蛋白質を発現するVSV-G発現プラスミドpVSV-G（Clontech）120ng、ネガティブ鎖RNAウイルスのHA（またはHN）、F、およびM蛋白発現プラスミド（pCAGGS中）のそれぞれ240ngを任意に組み合わせて100 μlのOpti MEMに溶解後6 μlのPLUS Reagent（Gibco BRL）を加えて攪拌、15分間室温で静置する。これに、100 μlのOpti MEMで希釈した4 μlのLIPOFECTAMINE Reagent（Gibco BRL）を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37℃、10% CO₂下で3時間カルチャーする。1ウェルあたり1mlの1%ウシ血清アルブミン、および15 μg/ml（HAの場合10 μg/ml）のトリプシン（Gibco BRL）を含むDMEMを加え、37℃、10% CO₂で、24時間培養する。その後1ウェルあたり2 mlの1%ウシ血清アルブミン、7.5 μg/ml（HAの場合5 μg/ml）のトリプシン（Gibco BRL）および0.01 unitのグラム陽性菌（例えば放線菌）由来ノイラミニダーゼを含むDMEMに培地交換し、24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μmのフィルターで濾過してベクター溶液を得る。

ベクターの大量調製および濃縮は、例えば以下のようにして行われる。例えば

、293T細胞を15cmのプラスチックシャーレへ1枚あたり 5×10^6 個でまき、37℃、10% CO₂で48時間カルチャーする。培養液を1ウェルあたり10mlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いる。シャーレ1枚あたりジーントランスファーベクター 8 μ g、パッケージングベクター 2.4 μ g、それにVSV-G発現プラスミドpVSV-G (Clontech) 0.8 μ g、ネガティブ鎖RNAウイルスのHA (またはHN) およびF蛋白発現プラスミド (pCAGGS中) のそれぞれ 1.6 μ gを任意に組み合わせて、1.5mlのOpti MEMに溶解後、40 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置する。これに、60 μ lのLIPOFECTAMINE Reagent (Gibco BRL) を添加した1.5mlのOpti MEMを加え攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37℃、10% CO₂下で3時間カルチャーする。シャーレ1枚あたり10mlの1%ウシ血清アルブミン、15 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37℃、10% CO₂で、24時間培養する。シャーレ1枚あたり20mlの1%ウシ血清アルブミン、7.5 μ g/ml (HAの場合5 μ g/ml)のトリプシン (Gibco BRL) および 0.05~0.5 U 程度のグラム陽性菌 (例えば放線菌) 由来NAを含むD-MEMに培地交換し、37℃、10% CO₂で、24時間培養した後培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過し、42,490 \times g (F/HNの場合16,000 \times g) (TOMY SRX-201, TA21BH)、4℃、90分遠心する。ペレットをPBS (5% FCS, 2 μ g/ml polybrene) に溶解し、使用まで-80℃に保存する。

例えば、インフルエンザウイルスHA蛋白質でシュードタイプ化したレンチウイルスベクターは濃縮が可能である。濃縮は、例えば次のようにして実施できる。293T細胞を15cmのプラスチックシャーレへ1枚あたり 5×10^6 個でまき、37℃、10% CO₂で48時間カルチャーする。培養液をシャーレ1枚あたり10mlの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。シャーレ1枚あたりジーントランスファーベクター (pGL3C/CMV. U3G2/RREc/s/CMV LacZ/3LTR Δ U3) 8 μ g、パッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) 2.4 μ g、インフルエンザHA蛋白発現プラスミドpCAGGS-HA 1.6 μ gを1.5mlのOpti MEM (Gibco BRL) に溶

解後、40 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置する。これに、1.5mlのOpti MEMで希釈した60 μ lのLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C、10% CO₂で3時間カルチャーする。シャーレ1枚あたり10mlの1%ウシ血清アルブミンおよび10 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37°C、10% CO₂で16~24時間カルチャーした後に、シャーレ1枚あたり20mlの1%ウシ血清アルブミン、5 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) および および 0.05~0.5 U 程度のグラム陽性菌 (例えば放線菌) 由来NAを含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過する。16,000 \times g (Beckman J-25I、JA-18)、4°C、1時間遠心する。ペレットをPBS (5%FCS、2 μ g / mlポリブレンを含む) に溶解し、-80°Cで保存する。インフルエンザウイルスHAを用いることにより、VSV-Gなど他のエンベロープ蛋白質を共発現させることなく遺伝子導入が認められる。HAシュードタイプベクターは遠心により高度の濃縮が可能である。

シアル酸結合活性を持つ2種またはそれ以上の蛋白質を用いて、シュードタイプレンチウイルスベクターを作製することも可能である。例えば、インフルエンザウイルスおよびセンダイウイルスエンベロープシュードタイプレンチウイルスベクターの製造の例を示す。

<細胞培養>

293T細胞 (ヒト胎児腎臓由来細胞株) は、10%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含むDMEM高グルコース (Gibco BRL) を用いて、37°C、10%CO₂で培養する。

<ベクターの作製>

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり5 \times 10⁵個でまき、37°C、10% CO₂で48時間カルチャーする。培養液を1ウェルあたり800 μ lの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いる。

。1 ウェルあたりジーントランスファーベクター (pGL3C/CMVL. U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTR ΔU3) 1200ng、パッケージングベクター (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) 360ng、Sendai virus HN蛋白発現プラスミド pCAGGS-HN および HA蛋白発現プラスミドそれぞれ 240ng を 100 μl の Opti MEM (Gibco BRL) に溶解後 6 μl の PLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15 分間室温で静置する。これに、100 μl の Opti MEM で希釈した 4 μl の LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で 15 分間静置し、これを上記の 293T 細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37℃、10% CO₂ で 3 時間カルチャーする。1 ウェルあたり 1ml の 1% ウシ血清アルブミン および 10 μg/ml のトリプシン (Gibco BRL) を含む DMEM を加え、37℃、10% CO₂ で 16~24 時間カルチャーした後に、1 ウェルあたり 2ml の 1% ウシ血清アルブミン、5 μg/ml のトリプシン (Gibco BRL) を含む DMEM に培地交換し、その 24 時間培養後する。その後 1 ウェルあたり 2 ml の 1% ウシ血清アルブミン、5 μg/ml のトリプシン (Gibco BRL) および 0.01 unit のグラム陽性菌 (例えば放線菌) 由来ノイラミニダーゼを含む DMEM に培地交換し、24 時間培養後に培養上清を回収、0.45 μm のフィルターで濾過してウイルス溶液を得る。

本発明の方法で製造されたベクターは、周知のウイルス精製方法により精製することができる。精製方法は、上記した遠心分離、あるいはフィルトレーション (濾過)、吸着、およびカラム精製等を含む公知の精製・分離方法またはその組み合わせにより行うことができる。これにより、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質を含む実質的に純粋なウイルスベクターを得ることができる。実質的に純粋なウイルスベクターとは、該ウイルスベクターが、核酸を細胞に導入する能力を持つ他のウイルスベクターを実質的に有さないことを言う。実質的に純粋なウイルスベクターは、ウイルス産生細胞の細胞破砕物や他の不純物を含まないことが好ましい。

本発明の方法で製造されたウイルスベクターは、薬学的に許容される担体または媒体と適宜組み合わせて組成物とすることができる。「薬学的に許容される担

体または媒体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を有意に阻害しない材料である。具体的には、例えば滅菌水、生理食塩水、培養液、血清、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などと適宜組み合わせて製剤化することが考えられる。さらに、その他にも、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。本発明の組成物は、水溶液、カプセル、懸濁液、シロップなどの形態であり得る。本発明の方法で製造されたウイルスベクターを含む組成物は試薬または医薬として有用である。該組成物は、例えば、各種細胞に対するインビトロまたはインビボでの遺伝子導入試薬として、または、エキスピボまたはインビボでの遺伝子治療のための医薬として有用である。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、腹腔内注射、皮下注射、経腸投与、経口投与、鼻腔内投与、エキスピボ投与など当業者に公知の方法により行いうる。特に鼻腔または気管支粘膜への投与、および血球系・造血系細胞へのエキスピボ投与は好適である。ベクターの投与量は、疾患、患者の体重、年齢、性別、症状、投与目的、投与組成物の形態、投与方法、導入遺伝子等により異なるが、当業者であれば適宜決定することが可能である。

本発明の方法で製造されたウイルスベクターは、各種遺伝性疾患の遺伝子治療にも応用が可能である。対象となる疾患は特に制限されない。例えば、対象となり得る疾患とその単一原因遺伝子としては、ゴーシェ病においては β -セレブロシダーゼ（第20染色体）、血友病においては血液凝固第8因子（X染色体）および血液凝固第9因子（X染色体）、アデノシンデアミナーゼ欠損症においてはアデノシンデアミナーゼ、フェニルケトン尿症においてはフェニルアラニンヒドロキシラーゼ（第12染色体）、Duchenne型筋ジストロフィーにおいてはジストロフィン（X染色体）、家族性高コレステロール血症においてはLDLレセプター（第19染色体）、嚢嚢ほう性繊維症においてはCFTR遺伝子の染色体への組み込み等が挙げられる。それら以外の複数の遺伝子が関与していると思われる対象疾患としては、アルツハイマー、パーキンソン病等の神経変性疾患、虚血性脳障害、痲

呆、またエイズ等の難治性の感染症等が考えられる。エイズ患者の造血幹細胞を細胞外にとりだしin vitroでSIVベースの本発明の方法で製造されたベクターを導入し、HIVの感染が起こる前にSIVに由来するゲノム転写を優勢にして、患者の体に戻し、HIVの転写因子を無効にする治療方法が考えられる。さらには、慢性疾患への応用として、虚血性心疾患においてはVEGFならびにFGF2遺伝子、動脈硬化の遺伝子治療に関しては、細胞増殖関連遺伝子、例えば細胞増殖因子（PDGF、TGF- β 等）、Cyclin-dependent kinase等の発現抑制への応用が可能となる。また糖尿病においてはBDNF遺伝子が候補となりうる。またこの方法により、遺伝子変異が癌化を引き起こす癌抑制遺伝子p53等の遺伝子を染色体に組み込む補充治療への応用、多剤耐性遺伝子をin vitroで骨髄由来造血幹細胞に導入した後、患者の血液に戻すことによって、癌の薬物治療の限界を超えた治療が可能となる。自己免疫疾患、例えば多発性硬化症、慢性関節リウマチ、SLE、糸球体腎炎等の遺伝子治療に関しては、T細胞レセプター、各種接着因子（例えばICAM-1、LFA-1、VCAM-1、LFA-4等）、サイトカインおよびサイトカインレセプター（例えばTNF、IL-8、IL-6、IL-1等）、細胞増殖因子（例えばPDGF、TGF- β 等）、作用因子（例えばMMP等）のアンチセンス発現による発現抑制への応用が可能となる。アレルギー性疾患の遺伝子治療に関しては、IL-4、Fc ϵ R-I等のアンチセンス発現による発現抑制への応用が可能となる。臓器移植に関連する遺伝子治療に関しては、ヒト以外の動物ドナーの組織適合性抗原をヒト型に変えて異種移植の成功率を高める応用が可能となる。さらにはヒトES細胞の染色体に外来遺伝子を導入し、胚の段階で欠損する遺伝子を補って、体循環する酵素、成長因子等の不足を補充する治療が考えられる。

例えば、IL-4はヘルパーTリンパ球のTh2リンパ球への分化を促す。Th2リンパ球はIL-4、IL-5、IL-9、IL-13といった喘息の炎症を媒介するサイトカインを分泌する。IL-4は呼吸障害に関与する肺粘液膜からの粘液分泌を誘導する分子の1つである。IL-4は、好酸球表面に存在するVLA 4分子と相互作用する細胞接着分子であ

るVCAM-1の発現を制御している。この相互作用により、好酸球は血液中から肺組織の炎症部位へ移動することができる。IL-4はB細胞の増強と、アレルギー反応を引き起こすために必要な抗原特異的IgEの産生を誘導する。抗原特異的IgEはマスト細胞がヒスタミン、ロイコトリエンといった炎症の媒介となる物質の放出を引き起こし、これらが、気管支収縮を引き起こす。このようなIL-4の役割から、喘息患者を対象とした可溶性インターロイキン4 (IL-4) 受容体などを発現するベクターも有用である。

図面の簡単な説明

図1は、*Micromonospora viridifaciens* 由来 NA を用いて製造したウイルスによる遺伝子導入を示す写真である（右側のNA）。対照として *Vibrio cholerae* 由来のNAを用いて同様にウイルスを製造し、同量のウイルス産生細胞の培養上清を用いて遺伝子を導入した（左側のvcNA）。

図2は、*Vibrio cholerae*由来 NA を用量を変えて用いて製造した場合のウイルスの力価を示す写真である。ウイルス産生細胞の培養上清を同量用い、それぞれ同じ条件下で遺伝子導入を行なった。各パネルの上の数値はノイラミニダーゼ添加量 (unit) を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本明細書中に引用された文献は、本明細書の一部として組み込まれる。

〔実施例1〕 グラム陽性菌由来のNAを使用したインフルエンザウイルスエンベロープシュードタイプSIVベクターの調製

細胞培養

293T細胞（ヒト胎児腎臓由来細胞株）（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90,

pp. 8392-8396, 1993) は、10%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含むDMEM 高グルコース (Gibco BRL) を用いて、37°C、10% CO₂で培養した。

ベクターの作製

293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり 5×10^5 個でまき、37°C 10% CO₂で48時間カルチャーした。培養液を1ウェルあたり800 μ lの1%ウシ血清アルブミンを含むDMEMに置換してトランスフェクションに用いた。1ウェルあたりジーントランスファーベクター pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTR Δ U3 1200ng、パッケージングベクター pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev 360 ng、HA蛋白発現プラスミドpCAGGS-HA 240ngを100 μ lのOpti MEM (Gibco BRL) に溶解後 6 μ lのPLUS Reagent (Gibco BRL) を加えて攪拌、15分間室温で静置した (W001/92508)。これに、100 μ lのOpti MEMで希釈した4 μ lのLIPOFECTAMINE (Gibco BRL) を添加して攪拌後さらに室温で15分間静置し、これを上記の293T細胞に滴下して緩やかに攪拌し、37°C 10% CO₂で3時間カルチャーした。1ウェルあたり1 mlの1%ウシ血清アルブミンおよび10 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) を含むDMEMを加え、37°C 10% CO₂で16~24時間カルチャーした後に、1ウェルあたり2 mlの1%ウシ血清アルブミン、5 μ g/mlのトリプシン (Gibco BRL) および0.01 unitの *M. viridifaciens*精製ノイラミニダーゼを含むDMEMに培地交換し、その24時間培養後に培養上清を回収、0.45 μ mのフィルターで濾過したものを使用した。対照として、*V. cholerae*の精製ノイラミニダーゼ (Roche) 0.05 unit を用いて同様にベクターを製造した。

SIVagmベクターによる遺伝子導入

標的となる293T細胞を6ウェルのプラスチックカルチャープレートへ1ウェルあたり 1×10^6 個でまき、37°C、10% CO₂で48時間培養した。カルチャープレートより培養液を除去し、ベクター液にポリブレン (Sigma) を最終濃度 8 μ g / mlで添加したものを1 ml 重層し、37°C、10% CO₂で3時間培養し、ベクターを感染させた。3時間後に20%非働化仔ウシ血清 (BIO WHITTAKER) を含む培養液を1 ml

加え、37°C、10% CO₂で48～72時間培養した。

ベクターの力価測定

ベクターの力価測定は、ベクター液 1 ml によって遺伝子導入される細胞の数によって計算した。上記の方法で 1 ml のベクター液を感染、感染後72時間後に蛍光倒立型顕微鏡（DMIRB(SLR)、ライカ）にて200倍の倍率で検鏡、視野内の遺伝子導入細胞（GFP陽性細胞）数を測定し、3視野の平均を求め、視野の面積とプレート面積よりもとめた係数854.865をかけることにより力価の算出を行った。力価の単位は Transducing Unit(TU) / mlで表記することとした。その結果、*V. cholerae*由来NA（VcNA）を用いた場合の力価が 2.8×10^4 (TU/ml) であったのに対し、*M. viridifaciens*由来NA（MvNA）を用いた場合の力価は 1.1×10^5 と有意に高かった（図1）。

【実施例2】 HAシュードタイプSIVベクターの製造における*V. cholerae*由来NAの添加量の効果

上記と同様のHAシュードタイプSIVベクターの調製において、*V. cholerae*由来のNAを添加量を変えて用い、その効果を検証した。その結果、NAの添加量が0.01～0.1 U（0.005～0.05 U/ml）の間で力価にほとんど変化はなかった。この結果より、*V. cholerae*由来のNAを使用したベクターの力価が低いのは、使用したNAの量が少ないことによるものではないと考えられる（図2）。

産業上の利用の可能性

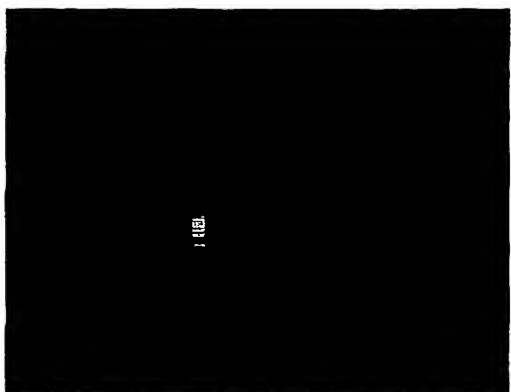
本発明により、グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼを用いて、シアル酸結合活性を有する膜蛋白質をエンベロープに含むウイルスベクターを製造する新規な方法が提供された。グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼは安価であり、低用量でも高い力価のウイルス産生が可能であることから、工業的なウイルスの大量生産において、本発明の方法はコストパフォーマンスに優れている。製造されるベクターは、遺伝子治療などの臨床場面において好適に用いられる。

請求の範囲

1. シアル酸結合活性を有する膜蛋白質を含むウイルスベクターの製造方法であって、グラム陽性菌由来ノイラミニダーゼの存在下で該ウイルスベクター産生細胞を培養し、産生されたウイルスを回収する工程を含む方法。
2. グラム陽性菌が放線菌である、請求項1に記載の方法。
3. 放線菌が、ミクロモノスポラ科 (*Micromonosporaceae*) に属する放線菌である、請求項2に記載の方法。
4. ミクロモノスポラ科に属する放線菌が、ミクロモノスポラ・ビリディファシエンス (*Micromonospora viridifaciens*) である、請求項3に記載の方法。
5. ウイルスベクターが、レトロウイルスベクターである、請求項1から4のいずれかに記載の方法。
6. レトロウイルスベクターが、レンチウイルスベクターである、請求項5に記載の方法。
7. シアル酸結合活性を有する膜蛋白質が、一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスのエンベロープ蛋白質である、請求項1から6のいずれかに記載の方法。
8. 一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルスが、パラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) またはオルトミクソウイルス科 (*Orthomyxoviridae*) に属するウイルスである、請求項7に記載の方法。
9. シアル酸結合活性を有する膜蛋白質が、インフルエンザウイルスのHA蛋白質である、請求項1から6のいずれかに記載の方法。
10. 請求項1から9のいずれかに記載の方法により製造されたウイルス。

☒ 1

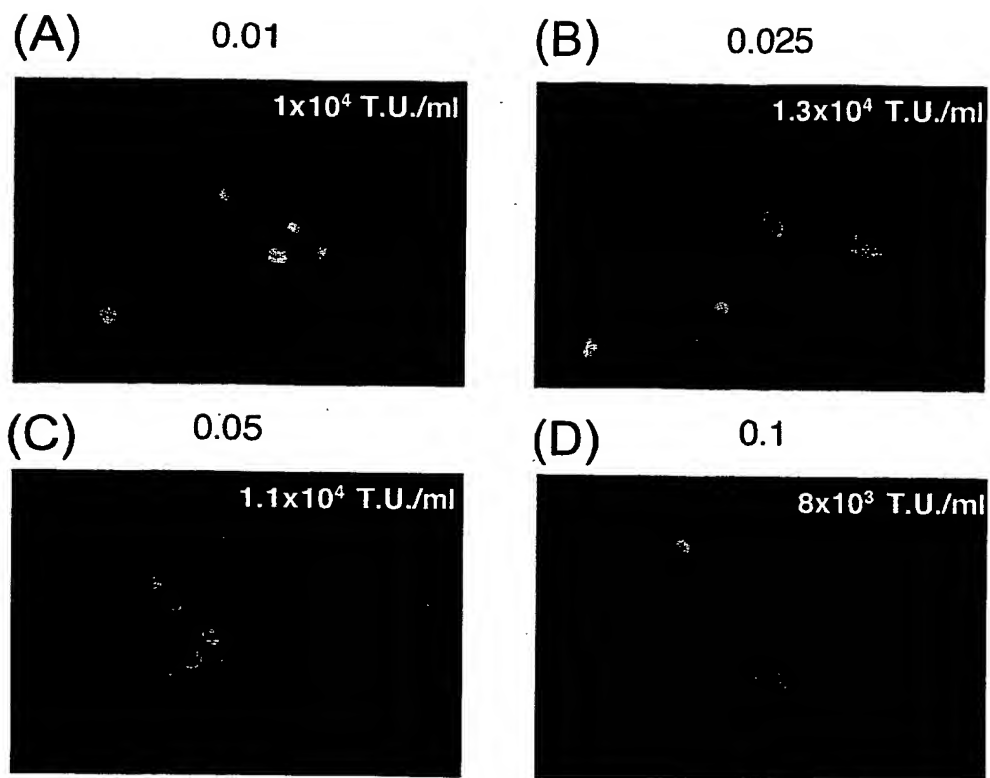
(A) vcNA



(B) NA



図 2



ノイラミニダーゼ添加量(unit)

SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC RESEARCH INC.

<120> Method of producing virus vectors having a membrane protein
that has sialic acid-binding activity in envelope thereof
using neuraminidase derived from Gram-positive bacteria

<130> D3-A0204P

<150> JP 2002-258576

<151> 2002-09-04

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1941

<212> DNA

<213> *Micromonospora viridifaciens*

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1941)

<223>

<400> 1

atg act gcg aat ccg tac ctc cgc cgc ctg ccc cgg cgc cga gcc gtc 48

Met Thr Ala Asn Pro Tyr Leu Arg Arg Leu Pro Arg Arg Arg Ala Val

1 5 10 15

agc ttc ctg ctc gca cca gcg ctg gcg gcc gcc acg gtc gcc ggc gcg 96

Ser Phe Leu Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Gly Ala

20 25 30

tcc ccc gca cag gcc atc gcc ggg gca ccc gtc ccg ccc ggc ggc gag 144

Ser Pro Ala Gln Ala Ile Ala Gly Ala Pro Val Pro Pro Gly Gly Glu

35 40 45

ccg ctc tac acg gag cag gac ctc gcc gtg aac ggc agg gag ggc ttt 192

Pro Leu Tyr Thr Glu Gln Asp Leu Ala Val Asn Gly Arg Glu Gly Phe

50 55 60

ccg aac tac cgc atc cca gcg ctg acc gtc acg ccc gac ggc gac ctg 240

Pro Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Leu Thr Val Thr Pro Asp Gly Asp Leu

65 70 75 80

ctg gcc tcg tac gac ggc cgc ccg acc ggt atc gac gcg ccc ggc ccc 288

Leu Ala Ser Tyr Asp Gly Arg Pro Thr Gly Ile Asp Ala Pro Gly Pro

85 90 95

aac tcc atc ctc caa cgc cgc agc acc gac ggc ggc cgg acg tgg ggc 336
Asn Ser Ile Leu Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Arg Thr Trp Gly
100 105 110

gag caa cag gtc gtc agc gcc ggc cag acc acc gcg ccg atc aag ggg 384
Glu Gln Gln Val Val Ser Ala Gly Gln Thr Thr Ala Pro Ile Lys Gly
115 120 125

ttc tcc gac ccc agc tac ctt gtc gac cgg gaa acc ggg acc atc ttc 432
Phe Ser Asp Pro Ser Tyr Leu Val Asp Arg Glu Thr Gly Thr Ile Phe
130 135 140

aac ttc cac gtc tac tcc cag cgg cag ggc ttc gcc ggc agc cgg ccc 480
Asn Phe His Val Tyr Ser Gln Arg Gln Gly Phe Ala Gly Ser Arg Pro
145 150 155 160

ggc acc gac ccg gca gac ccc aac gtg ctc cac gcc aac gtc gcg acc 528
Gly Thr Asp Pro Ala Asp Pro Asn Val Leu His Ala Asn Val Ala Thr
165 170 175

tcg acc gac ggc ggt ctg acc tgg tcg cac cgg acc atc acg gcc gac 576
Ser Thr Asp Gly Gly Leu Thr Trp Ser His Arg Thr Ile Thr Ala Asp
180 185 190

atc acc ccg gat ccg ggc tgg cgc agc cgc ttc gcc gcc tcc ggc gaa 624
Ile Thr Pro Asp Pro Gly Trp Arg Ser Arg Phe Ala Ala Ser Gly Glu

195	200	205	
ggc atc cag ctc cgc tat gga ccc cac gcc ggt cga ctc atc cag cag			672
Gly Ile Gln Leu Arg Tyr Gly Pro His Ala Gly Arg Leu Ile Gln Gln			
210	215	220	
tac acg atc atc aac gct gcc ggc gcc ttc cag gcg gtg agc gtg tac			720
Tyr Thr Ile Ile Asn Ala Ala Gly Ala Phe Gln Ala Val Ser Val Tyr			
225	230	235	240
agc gac gac cac gga agg acc tgg cgc gcc ggc gaa gcc gtc ggg gtc			768
Ser Asp Asp His Gly Arg Thr Trp Arg Ala Gly Glu Ala Val Gly Val			
245	250	255	
ggc atg gac gag aac aag acc gtg gaa ctc tcc gat ggc cgg gtc ctg			816
Gly Met Asp Glu Asn Lys Thr Val Glu Leu Ser Asp Gly Arg Val Leu			
260	265	270	
ctc aac agc cgc gac tcg gcc cgc agc gga tac cgt aag gtg gcc gtc			864
Leu Asn Ser Arg Asp Ser Ala Arg Ser Gly Tyr Arg Lys Val Ala Val			
275	280	285	
tcc act gac ggc ggc cac agc tac ggc ccg gtg acc atc gac cgc gac			912
Ser Thr Asp Gly Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Thr Ile Asp Arg Asp			
290	295	300	

ctc ccc gac ccg acg aac aac gca tcg atc atc cgg gcc ttc cct gac 960
Leu Pro Asp Pro Thr Asn Asn Ala Ser Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asp
305 310 315 320

gcc ccg gcc ggc tcc gcg cgg gcc aag gtc ctg ctc ttc tcc aac gcc 1008
Ala Pro Ala Gly Ser Ala Arg Ala Lys Val Leu Leu Phe Ser Asn Ala
325 330 335

gcc agc cag acc tcg cgc agt cag ggc acc atc cgg atg tcc tgc gac 1056
Ala Ser Gln Thr Ser Arg Ser Gln Gly Thr Ile Arg Met Ser Cys Asp
340 345 350

gat ggc cag acc tgg ccg gtt tcg aag gtc ttc cag ccc ggc tcg atg 1104
Asp Gly Gln Thr Trp Pro Val Ser Lys Val Phe Gln Pro Gly Ser Met
355 360 365

tcg tac tcc acc ctg acc gca ctg ccc gac ggc acc tac ggg ctg ctg 1152
Ser Tyr Ser Thr Leu Thr Ala Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Leu Leu
370 375 380

tac gag ccg ggc acc ggc atc aga tac gcc aac ttc aac ctc gcc tgg 1200
Tyr Glu Pro Gly Thr Gly Ile Arg Tyr Ala Asn Phe Asn Leu Ala Trp
385 390 395 400

ctg ggc ggc atc tgc gcg ccc ttc acg att ccg gat gtg gcg ctc gag 1248
Leu Gly Gly Ile Cys Ala Pro Phe Thr Ile Pro Asp Val Ala Leu Glu

405	410	415	
ccg ggc cag cag gtc act gtt ccg gtg gcc gtc acg aac cag tcc ggt			1296
Pro Gly Gln Gln Val Thr Val Pro Val Ala Val Thr Asn Gln Ser Gly			
420	425	430	
atc gcg gta ccg aag ccg agc ctt cag ctc gac gca tcg ccg gac tgg			1344
Ile Ala Val Pro Lys Pro Ser Leu Gln Leu Asp Ala Ser Pro Asp Trp			
435	440	445	
cag gtt cag ggt tcc gtc gag ccc ctc atg ccc gga cgg cag gcc aag			1392
Gln Val Gln Gly Ser Val Glu Pro Leu Met Pro Gly Arg Gln Ala Lys			
450	455	460	
ggc cag gtg acc atc acg gtt ccc gcc ggc acc acc ccc ggt cgc tac			1440
Gly Gln Val Thr Ile Thr Val Pro Ala Gly Thr Thr Pro Gly Arg Tyr			
465	470	475	480
cgg gtc ggt gcg acg ctg cgc acc tcc gcg ggt aac gcg tcg acg acc			1488
Arg Val Gly Ala Thr Leu Arg Thr Ser Ala Gly Asn Ala Ser Thr Thr			
485	490	495	
ttc acg gtc acg gtt gga ctg ctc gac cag gcc cgg atg agc atc gcg			1536
Phe Thr Val Thr Val Gly Leu Leu Asp Gln Ala Arg Met Ser Ile Ala			
500	505	510	

gac gtc gac agc gag gag acc gcc cgc gaa gac ggg cgg gcg agc aac 1584

Asp Val Asp Ser Glu Glu Thr Ala Arg Glu Asp Gly Arg Ala Ser Asn

515

520

525

gtg atc gac ggc aac ccc tcg acg ttc tgg cac acc gaa tgg tcg cgt 1632

Val Ile Asp Gly Asn Pro Ser Thr Phe Trp His Thr Glu Trp Ser Arg

530

535

540

gcc gat gct cct ggc tac ccg cac cgc atc agc ctc gac ctc ggt ggc 1680

Ala Asp Ala Pro Gly Tyr Pro His Arg Ile Ser Leu Asp Leu Gly Gly

545

550

555

560

acg cac acg atc agc ggc ctc cag tac acc cga cgg cag aac agc gcc 1728

Thr His Thr Ile Ser Gly Leu Gln Tyr Thr Arg Arg Gln Asn Ser Ala

565

570

575

aac gag cag gtc gcg gac tac gag atc tac acc agc ctg aac ggc acg 1776

Asn Glu Gln Val Ala Asp Tyr Glu Ile Tyr Thr Ser Leu Asn Gly Thr

580

585

590

acc tgg gat ggc ccg gtt gcc agc ggg cgc ttc acc acg tcc ctc gcg 1824

Thr Trp Asp Gly Pro Val Ala Ser Gly Arg Phe Thr Thr Ser Leu Ala

595

600

605

ccg cag cgc gcg gtc ttc ccg gcg cgg gac gcc agg tac atc cgg ttg 1872

Pro Gln Arg Ala Val Phe Pro Ala Arg Asp Ala Arg Tyr Ile Arg Leu

610

615

620

gtg gcc ctc agc gag cag acc ggg cac aag tac gcc gcg gtc gct gag 1920

Val Ala Leu Ser Glu Gln Thr Gly His Lys Tyr Ala Ala Val Ala Glu

625

630

635

640

ctg gag gtg gaa ggc cag cgc

1941

Leu Glu Val Glu Gly Gln Arg

645

<210> 2

<211> 647

<212> PRT

<213> Micromonospora viridifaciens

<400> 2

Met Thr Ala Asn Pro Tyr Leu Arg Arg Leu Pro Arg Arg Arg Ala Val

1

5

10

15

Ser Phe Leu Leu Ala Pro Ala Leu Ala Ala Ala Thr Val Ala Gly Ala

20

25

30

Ser Pro Ala Gln Ala Ile Ala Gly Ala Pro Val Pro Pro Gly Gly Glu

35

40

45

Pro Leu Tyr Thr Glu Gln Asp Leu Ala Val Asn Gly Arg Glu Gly Phe

50

55

60

Pro Asn Tyr Arg Ile Pro Ala Leu Thr Val Thr Pro Asp Gly Asp Leu

65

70

75

80

Leu Ala Ser Tyr Asp Gly Arg Pro Thr Gly Ile Asp Ala Pro Gly Pro

85

90

95

Asn Ser Ile Leu Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Arg Thr Trp Gly

100

105

110

Glu Gln Gln Val Val Ser Ala Gly Gln Thr Thr Ala Pro Ile Lys Gly

115

120

125

Phe Ser Asp Pro Ser Tyr Leu Val Asp Arg Glu Thr Gly Thr Ile Phe

130

135

140

Asn Phe His Val Tyr Ser Gln Arg Gln Gly Phe Ala Gly Ser Arg Pro
145 150 155 160

Gly Thr Asp Pro Ala Asp Pro Asn Val Leu His Ala Asn Val Ala Thr
165 170 175

Ser Thr Asp Gly Gly Leu Thr Trp Ser His Arg Thr Ile Thr Ala Asp
180 185 190

Ile Thr Pro Asp Pro Gly Trp Arg Ser Arg Phe Ala Ala Ser Gly Glu
195 200 205

Gly Ile Gln Leu Arg Tyr Gly Pro His Ala Gly Arg Leu Ile Gln Gln
210 215 220

Tyr Thr Ile Ile Asn Ala Ala Gly Ala Phe Gln Ala Val Ser Val Tyr
225 230 235 240

Ser Asp Asp His Gly Arg Thr Trp Arg Ala Gly Glu Ala Val Gly Val

245

250

255

Gly Met Asp Glu Asn Lys Thr Val Glu Leu Ser Asp Gly Arg Val Leu

260

265

270

Leu Asn Ser Arg Asp Ser Ala Arg Ser Gly Tyr Arg Lys Val Ala Val

275

280

285

Ser Thr Asp Gly Gly His Ser Tyr Gly Pro Val Thr Ile Asp Arg Asp

290

295

300

Leu Pro Asp Pro Thr Asn Asn Ala Ser Ile Ile Arg Ala Phe Pro Asp

305

310

315

320

Ala Pro Ala Gly Ser Ala Arg Ala Lys Val Leu Leu Phe Ser Asn Ala

325

330

335

Ala Ser Gln Thr Ser Arg Ser Gln Gly Thr Ile Arg Met Ser Cys Asp

340

345

350

Asp Gly Gln Thr Trp Pro Val Ser Lys Val Phe Gln Pro Gly Ser Met

355

360

365

Ser Tyr Ser Thr Leu Thr Ala Leu Pro Asp Gly Thr Tyr Gly Leu Leu

370

375

380

Tyr Glu Pro Gly Thr Gly Ile Arg Tyr Ala Asn Phe Asn Leu Ala Trp

385

390

395

400

Leu Gly Gly Ile Cys Ala Pro Phe Thr Ile Pro Asp Val Ala Leu Glu

405

410

415

Pro Gly Gln Gln Val Thr Val Pro Val Ala Val Thr Asn Gln Ser Gly

420

425

430

Ile Ala Val Pro Lys Pro Ser Leu Gln Leu Asp Ala Ser Pro Asp Trp

435

440

445

Gln Val Gln Gly Ser Val Glu Pro Leu Met Pro Gly Arg Gln Ala Lys

450

455

460

Gly Gln Val Thr Ile Thr Val Pro Ala Gly Thr Thr Pro Gly Arg Tyr

465

470

475

480

Arg Val Gly Ala Thr Leu Arg Thr Ser Ala Gly Asn Ala Ser Thr Thr

485

490

495

Phe Thr Val Thr Val Gly Leu Leu Asp Gln Ala Arg Met Ser Ile Ala

500

505

510

Asp Val Asp Ser Glu Glu Thr Ala Arg Glu Asp Gly Arg Ala Ser Asn

515

520

525

Val Ile Asp Gly Asn Pro Ser Thr Phe Trp His Thr Glu Trp Ser Arg

530

535

540

Ala Asp Ala Pro Gly Tyr Pro His Arg Ile Ser Leu Asp Leu Gly Gly

545

550

555

560

Thr His Thr Ile Ser Gly Leu Gln Tyr Thr Arg Arg Gln Asn Ser Ala
565 570 575

Asn Glu Gln Val Ala Asp Tyr Glu Ile Tyr Thr Ser Leu Asn Gly Thr
580 585 590

Thr Trp Asp Gly Pro Val Ala Ser Gly Arg Phe Thr Thr Ser Leu Ala
595 600 605

Pro Gln Arg Ala Val Phe Pro Ala Arg Asp Ala Arg Tyr Ile Arg Leu
610 615 620

Val Ala Leu Ser Glu Gln Thr Gly His Lys Tyr Ala Ala Val Ala Glu
625 630 635 640

Leu Glu Val Glu Gly Gln Arg
645

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N7/00, C12N15/867

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N1/00-C12N15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	PING YANG et al., Hemagglutinin Specificity and Neuraminidase Coding Capacity of Neuraminidase-Deficient Influenza Viruses., Virology, 1997, Vol.229, No.1, pages 155 to 165	1-4, 7-10 5-6
Y	WO 01/92508 A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 06 December, 2001 (06.12.01), Claims; examples & EP 1291419 A1 & AU 6268401 A	5-6
Y	Jiangfeng Sun et al., Neuraminidase from a Bacterial Source Enhances Both HIV-1-Mediated Syncytium Formation and the Virus Binding/Entry Process., Virology, 2001, Vol.284, No.1, pages 26 to 36	5-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 October, 2003 (15.10.03)

Date of mailing of the international search report
28 October, 2003 (28.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11299

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Valerie Bosch et al., Inhibition of release of lentivirus particles with incorporated human influenza virus haemagglutinin by binding to sialic acid-containing cellular receptors., Journal of General Virology, 2001, Vol.82, pages 2485 to 2494	5-6
Y	Amy H. Lin et al., Use of pseudotyped retroviral vectors to analyze the receptor-binding pocket of hemagglutinin from a pathogenic avian influenza A virus(H7 type)., Virus Research, 26 February, 2002 (26.02.02), Vol.83, Nos.1 to 2, pages 43 to 56	5-6
P,A	Masanori KOBAYASHI et al., Pseudotype Lentivirus Vectors Derived from Simian Immunodeficiency Virus SIVagm with Envelope Glycoproteins from Paramyxovirus., J.Virology, February 2003, Vol.77, No.4, pages 2607 to 2614	1-10
P,A	WO 03/66868 A1 (OXFORD BIOMEDICA (UK) LTD.), 14 August, 2003 (14.08.03), Full text (Family: none)	1-10
A	WO 99/13905 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA), 25 March, 1999 (25.03.99), Full text (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl⁷ C12N7/00, C12N15/867

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int Cl⁷ C12N1/00-C12N15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	PING YANG, et al., Hemagglutinin Specificity and Neuraminidase Coding Capacity of Neuraminidase-Deficient Influenza Viruses. Virology, 1997, Vol.229, No.1, p155-165	1-4, 7-10 5-6
Y	WO 01/92508 A1 (DNAMEC RESEARCH INC.), 2001. 12. 06, 特許請求の範囲、各実施例 &EP 1291419 A1 &AU 6268401 A	5-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等而言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15. 10. 03

国際調査報告の発送日

28.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JJP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 耕一郎



4B

9636

電話番号 03-3581-1101 内線 3446

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Jiangfeng Sun, et. al., Neuraminidase from a Bacterial Source Enhances Both HIV-1-Mediated Syncytium Formation and the Virus Binding/Entry Process. Virology, 2001, Vol.284, No.1, p26-36	5-6
Y	Valerie Bosch, et. al., Inhibition of release of lentivirus particles with incorporated human influenza virus haemagglutinin by binding to sialic acid-containing cellular receptors. Journal of General Virology, 2001, Vol.82, p2485-2494	5-6
Y	Amy H. Lin, et. al., Use of pseudotyped retroviral vectors to analyze the receptor-binding pocket of hemagglutinin from a pathogenic avian influenza A virus(H7 type). Virus Research, 26 Feb. 2002, Vol.83, No.1-2, p43-56	5-6
P, A	Masanori Kobayashi, et. al., Pseudotype Lentivirus Vectors Derived from Simian Immunodeficiency Virus SIVagm with Envelope Glycoproteins from Paramyxovirus. J. Virology, Feb 2003, Vol.77, No.4, p2607-2614	1-10
P, A	WO 03/66868 A1 (OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED.) , 2003. 08. 14, 文献全体 (ファミリーなし)	1-10
A	WO 99/13905 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) , 1999. 03. 25, 文献全体 (ファミリーなし)	1-10

DESCRIPTION

METHODS OF PRODUCING A VIRAL VECTOR COMPRISING A MEMBRANE PROTEIN
THAT BINDS TO SIALIC ACID AS A COMPONENT OF THE ENVELOPE USING
NEURAMINIDASE DERIVED FROM GRAM-POSITIVE BACTERIA

Technical Field

The present invention relates to methods for producing a viral vector comprising a membrane protein that binds to sialic acid as a component of the envelope, using neuraminidase derived from Gram-positive bacteria.

Background Art

Glycoproteins containing sialic acid are present on the surface of most cells. Certain types of viruses possess a protein capable of binding to such sialic acid as a component of the envelope, which facilitates virus particles' adherence to the cells. For example, the influenza virus binds to sialic acid present on the cell surface through an envelope protein called hemagglutinin (HA). However, the binding to sialic acid on the host cell surface needs to be dissociated upon budding in viral replication steps, a process in which the neuraminidase protein (NA) of the influenza virus plays an important role. In addition, NA is reported to play a role in the inhibition of self-aggregation (Compans R.W. *et al.* J. Virol. 4: 528-534 (1969); Palese P. *et al.* Virology 61: 397-410 (1974); Griffin J.A. *et al.* Virology 125: 324-334 (1983); Liu C. *et al.* J. Virol. 69: 1099-1106 (1995)).

The binding activity of the HA protein has been recognized and appropriated in the preparation of HA pseudotyped viruses having improved gene transfection capacity. However, these pseudotyped viruses are characterized by a low viral titer without the inclusion of neuraminidase (Hatzioannou T. *et al.* J. Virol. 72: 5313-5317 (1998)). By exogenously supplying NA to the vector producing system, it is possible to promote the incorporation of the HA protein into virion and thus increase the titer (Dong J. *et al.* J. Virol. 66: 7374-7382 (1992); Negre D. *et al.* Gene Ther. 7: 1613-1623 (2000); Morse K.M. *et al.* The American Society of Gene Therapy's 5th Annual Meeting (2002); WO01/92508). Nevertheless, to date, the titer of HA pseudotyped viruses produced using purified NA currently available is not satisfactory.

Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide methods for producing a viral vector containing a membrane protein that binds to sialic acid as a component of the envelope, using neuraminidase derived from Gram-positive bacteria.

The conventional methods for the production of an HA pseudotyped viruses often use NA from *Vibrio cholerae*, which is categorized as Gram-negative bacteria. However, the titer of the vector produced using NA from *Vibrio cholerae* is low. Furthermore, it remains a challenge to produce such vectors in a large scale industrially. To develop a technology for producing a viral vector containing a membrane protein that binds to sialic acid as a component of the envelope not only at high titer but also at low cost, the present inventors searched for a novel NA that could be used for virus production. The present inventors discovered that, by using NA derived from Gram-positive bacteria, they could successfully produce a virus having significantly higher titer as compared to those produced with NA from *Vibrio cholerae*. Accordingly, the use of NA from Gram-positive bacteria should enable the industrial production of pseudotyped vectors in large scale in an efficient and economical way.

Thus, the present invention relates to methods of producing a viral vector containing a membrane protein that binds to sialic acid as a component of the envelope using a neuraminidase derived from Gram-positive bacteria. More specifically, it relates to:

- (1) a method for producing a viral vector comprising a membrane protein that binds to sialic acid, comprising the steps of culturing cells producing the viral vector in the presence of a neuraminidase derived from a Gram-positive bacterium, and recovering the produced virus;
- (2) the method of (1), wherein said Gram-positive bacterium is an actinomycete;
- (3) the method of (2), wherein said actinomycete belongs to the Micromonosporaceae family;
- (4) the method of (3), wherein said actinomycete belonging to the Micromonosporaceae family is *Micromonospora viridifaciens*;
- (5) the method according to any one of (1) to (4), wherein said viral vector is a retroviral vector;
- (6) the method of (5), wherein said retroviral vector is a lentiviral vector;
- (7) the method according to any one of (1) to (6), wherein said membrane protein that binds to sialic acid is an envelope protein of a single stranded negative strand RNA virus;
- (8) the method of (7), wherein said single stranded negative strand RNA virus is a virus belonging to the Paramyxoviridae or Orthomyxoviridae family;
- (9) the method according to any one of (1) to (6), wherein said membrane protein that binds to sialic acid is an HA protein of an influenza virus; and
- (10) a viral vector produced using the method according to any one of (1) to (9).

This invention provides methods of producing a viral vector containing a membrane protein that binds to sialic acid as a component of the envelope. Herein, "viral vector" means a virus particle capable of introducing a nucleic acid molecule into a host or infectious microparticle equivalent to it. The method of this invention comprises the steps of culturing viral vector-producing cells in the presence of neuraminidase derived from a Gram-positive bacterium, and collecting the produced virus. The inclusion of a neuraminidase from a

Gram-positive bacterium significantly increases the amount of virus collected from the virus-producing cells. Neuraminidase derived from *Actinomyces* is preferably used. The method of this invention can be applied for producing a desired viral vector containing an envelope derived from the plasma membrane. For example, the method of this invention may be preferably used to produce a negative strand RNA virus, retrovirus, poxvirus, herpes virus, and the like. In particular, the method of this invention is suitable for production of a retrovirus including lentivirus.

Any replication competent viruses or replication deficient viruses may be produced. For example, replication deficient viruses may be prepared by deleting from the viral genome a part or all of the virus gene(s) participating in the formation of infectious viral particles or their release. Specifically, a recombinant viral vector that is replication deficient, suitable for introducing a desired gene into the cell, can be produced by altering the viral genome so that the gene encoding the envelope or such is deleted while the nucleotide sequence(s) required for the incorporation of the viral genome into viral particle and the introduction of the viral nucleic acid(s) into the target cell are kept intact. For example, a replication deficient retrovirus may be created by removing a part or all of a gene encoding a viral protein such as gag, pol, and env from the viral genome RNA, while retaining only the sequence essential for virus packaging and gene transfection into the target cell (such as a part of the LTR). For producing viral particles, the genes necessary for their formation, among the deleted genes, may be expressed in virus-producing cells. Such viral particles, comprising a genome in which at least a part of the viral genes of the wild-type virus is deleted, are also included in the viral vectors in this invention.

In particular, the present invention is suitably used for production of recombinant virus. "Recombinant virus" means a virus generated using a recombinant polynucleotide. Recombinant polynucleotide means a polynucleotide in which one or both terminals are not linked in the same manner as in nature. Specifically, a recombinant polynucleotide is a polynucleotide in which the connection of the polynucleotide chain is altered (cut, or combined) artificially. Recombinant polynucleotides can be prepared using the combination of polynucleotide synthesis, treatment with nucleases, treatment with ligase, and such through methods commonly known in the art of recombinant DNA technology. A recombinant protein is a protein generated using a recombinant polynucleotide, or a protein synthesized artificially. For example, recombinant proteins may be produced by expressing a recombinant polynucleotide encoding it. Recombinant virus may be generated by expressing a polynucleotide encoding a viral genome constructed through genetic engineering, and reconstituting the virus.

A viral vector produced using the methods of this invention contains in its viral envelope a protein that binds to sialic acid. Such a viral vector may be a virus containing a protein that binds to sialic acid naturally, or one not containing such protein naturally but rather engineered to

artificially contain the protein in the envelope. A virus engineered to contain in its envelope a protein that is not found in the envelope of a natural virus (at all or contained very little) is called a pseudotyped virus regarding the protein. A pseudotyped virus that contains a different envelope protein may be produced, for example, by expressing the protein in virus-producing cells. Such a method is particularly suitable in the context of this invention, to produce a pseudotyped virus containing a membrane protein that binds to sialic acid.

A membrane protein that binds to sialic acid includes a protein containing a sialic acid binding region in the extracellular domain. Such a protein is not limited to any particular one; it may be a natural protein or an artificial protein. Membrane proteins that naturally bind to sialic acid are found in many virus envelope proteins, for example. A protein with such a capability can be identified by the activity of inducing hemagglutination (HA). A virus protein with the HA activity is often called hemagglutinin. Such a viral protein having HA activity is particularly suitable for production of the virus of this invention.

The HA activity is found in a variety of viruses. A protein carrying the HA activity of those viruses may be used for the production of the virus of this invention as it is or through alteration, by making a chimeric protein with another protein(s), or such. The HA activity can be detected by using red blood cells from various species. The kind of red blood cells and optimal temperature for the reaction used frequently for detection of the HA activity are appropriately controlled according to the type of virus. For example, the calcium ion is reported to be essential for the reaction using rubella virus and the like. Likewise, in the case of arboviruses, the optimal pH for the reaction is strict. In enterovirus, rubella virus, and such, a virion itself is a protein carrying the HA activity. In viruses such as arbovirus and adenovirus, a protein carrying the HA activity exists as a particle smaller than a virion as well. Poxvirus hemagglutinin exists as a lipid-containing particle distinct from the virion. These proteins carrying the HA activity can be used to produce a virus having HA activity. Adenoviruses of the subgroup III induce incomplete agglutination, i.e., partial hemagglutination, of rat red blood cells. Such a protein may also be used as a membrane protein carrying the HA activity.

The HA activity of a particular viral protein (HA titer) may be tested by a commonly known method (Kokuritsu Yobou Eisei Kenkyujo Gakuyukai (ed.), General experimental virology, 2nd ed. pp. 214-225. Maruzen). Red blood cells may be prepared from chickens (including young and adult), geese, rats, guinea pigs, rhesus monkeys, green monkeys, or humans, for example. The temperature for incubation may be 0°C, 4°C, room temperature, or 37°C, conditions appropriate for each protein. Examples of conditions for the hemagglutination reaction using different viruses are discussed below.

The HA reaction associated with adenovirus is normally independent of pH, and performed at 37°C, for example. For adenoviruses of subgroup I, such as type 3, 7, 11, 14, 16,

20, 21, 25, and 28, for example, red blood cells from rhesus monkeys may be used. For adenoviruses of subgroup II, such as type 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 22, 23, 24, 26, and 27, for example, rat red blood cells may be used. For adenoviruses of subgroup III, such as type 1, 2, 4, 5, and 6, rat red blood cells may be used to induce incomplete agglutination.

5 The HA reaction associated with enterovirus is normally pH-independent. Among such, for Coxsackievirus of type A7, for example, chicken red blood cells may be used, and hemagglutination is induced at room temperature. For Coxsackievirus of type A20, A21, and A24, human red blood cells of type O may be used, for example, and hemagglutination is induced at 4°C. For Coxsackievirus of type B1, B3, and B5, human red blood cells of type O may be
10 used, for example, and hemagglutination is induced at 37°C. For Echovirus of type 3, 6, 7, 11, 12, 13, 19, 20, 21, 24, and 29, for example, human red blood cells of type O may be used, for example, and hemagglutination is induced at 4°C.

The HA reaction associated with reovirus is normally pH-independent, and performed at room temperature. For example, for type 1 and type 2, human type O red blood cells may be
15 used, and for type 3, bovine red blood cells may be used.

The HA reaction associated with negative strand RNA viruses, for example, with influenza virus, is performed at approximately pH 7.2. For type A and type B influenza virus, red blood cells may be prepared from chickens, humans, or guinea pigs, and hemagglutination is induced at room temperature. For type C, chicken red blood cells may be used, and the reaction
20 is performed at 4°C. For mumps virus and Newcastle disease virus (NDV), chicken red blood cells may be used, for example, and the reaction is performed at room temperature at pH 7.2 approximately. For parainfluenza virus, the HA reaction is normally pH independent, and chicken or human red blood cells may be used for type 1, and chicken red blood cells may be used for type 2 virus. The reaction is performed at 4°C, for example. For parainfluenza virus of type
25 3, the reaction may be performed at 4°C to room temperature using human or guinea pig red blood cells. For measles virus, the reaction may be performed using red blood cells from green monkeys, for example, at 37°C.

With arbovirus, the reaction is carried out strictly under acidic conditions, using red blood cells from geese or chicks, for example, at 37°C. For rhabdovirus, red blood cells from
30 geese may be used. For rabies virus, the reaction may be performed preferably at pH 6.4, at 0°C, for example. For vesicular stomatitis virus (VSV), the reaction may be performed preferably at pH 5.8, at 0°C, for example. For poxviruses including vaccinia virus and variola virus, the reaction is normally independent of pH, and carried out using chicken red blood cells at room temperature to 37°C, for example. For rubella virus, the reaction may be performed using
35 red blood cells from chicks or geese at 4°C, at approximately pH 6.2 or 7.2, for example. For polyoma virus, the reaction may be performed using guinea pig red blood cells at 4°C, pH 7.2, for

example. For rat virus (RV), the reaction may be performed using guinea pig red blood cells at room temperature, pH 7.2, for example. Any virus protein carrying the HA activity as described above, or its altered protein may be used for producing virus according to the method of this invention. Here, altered protein means a protein in which one or more amino acids are deleted, substituted, and/or inserted into a natural protein. Such a protein may also be used so long as it is a membrane protein that binds to sialic acid. Altered protein may comprise preferably a part of the amino acid sequence of the original protein, more preferably eight amino acids or more, more preferably nine amino acids or more, more preferably ten amino acids or more, and most preferably 15 amino acids or more of the original protein. Alternatively, the identity of an altered protein at amino acid sequence level compared with the original protein may be 70% or higher, more preferably 80% or higher, more preferably 85% or higher, and most preferably 90% or higher. Altered protein may be the original protein or a part of it to which other protein(s) is attached.

Among the membrane proteins comprised in the envelope of a viral vector that bind to sialic acid, specific examples of proteins particularly favorable for the use in this invention include the HN protein of Paramyxovirus, the HA protein of Orthomyxovirus, the E1 protein of Togavirus, the A27L, H3L, and D8L proteins of vaccinia virus, the M and E proteins of Flavivirus, the E1 and E2 proteins of Coronavirus, and the G1 protein of Bunyavirus. The envelope proteins of a single stranded negative strand RNA virus are particularly favorable; in particular, the HA protein of Orthomyxovirus is favorable.

"Single stranded negative strand RNA virus" means a virus having a single stranded negative strand ((-) strand) RNA as its genome. Examples include viruses of the Paramyxoviridae family such as *Paramyxovirus*, *Morbillivirus*, *Rubulavirus*, and *Pneumovirus*, viruses of the Rhabdoviridae family such as *Vesiculovirus*, *Lyssavirus*, and *Ephemerovirus*, viruses of the Firoviridae family, viruses of the Orthomyxoviridae family such as influenza virus A, B, C, and thogoto-like viruses, viruses of the Bunyaviridae family such as *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, and *Phlebovirus*, and viruses of the Arenaviridae family. In particular, the HA protein of a virus of the Orthomyxoviridae family is preferably used; the HA protein of influenza virus is preferred. In addition, the HN (or H) protein of the Sendai virus, rabies virus, or measles virus, for example, is also suitable. These proteins may be used in combination of other proteins. The proteins may be derived from a natural strain of virus, the wild type-virus, a mutant strain of the virus, a laboratory cultured strain, artificially constructed strain, and the like. The proteins may be a protein generated by alteration of a natural protein.

The membrane protein that binds to sialic acid may have another activity in addition to the sialic acid binding activity. For example, the HN protein of Paramyxovirus carries neuraminidase (NA) activity in addition to sialic acid binding activity (HA activity). While the

NA activity of an HN protein is by itself capable of promoting virus production, it is possible to produce virus more efficiently by using it together with NA from Gram-positive bacteria according to the method of this invention. Furthermore, two or more kinds of membrane proteins that bind to sialic acid may be used in combination in this invention. For example, the HA protein of Orthomyxovirus and the HN protein of Paramyxovirus may be used together to produce a pseudotyped virus of the two proteins in the method of this invention. The NA activity of the HN protein and the NA protein derived from Gram-positive bacteria should enable the release of virus from the cell at higher efficiency.

The methods of this invention result in the production of a viral vector containing a membrane protein that binds to sialic acid by culturing cells producing the viral vector in the presence of neuraminidase derived from Gram-positive bacteria in the steps of production of the viral vector. That is, the virus producing cells are cultured in a culture medium containing neuraminidase from a Gram-positive bacterium. Subsequently, the produced viruses are obtained by the step of recovering the produced viruses from the cell. Virus may be recovered by collecting the culture supernatant of virus producing cells, for example. Furthermore, a step of recovering virus from the culture supernatant may be included. Centrifugation, adsorption, filtration, or so may be performed to further purify or concentrate virus from the culture supernatant.

Neuraminidase (NA) (EC 3.2.1.18) is a protein capable of breaking a glycoside bond in sialic acid (an activity referred to herein as the NA activity). Specifically, NA is a protein capable of breaking a glycoside bond in sialic acid in glycoproteins or glycolipids on the cell membrane (Schauer R. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40: 131-234 (1982); Cabezas J.A. *Biochem. J.* 278: 311-312 (1991)). NA activity is defined by a unit (U), by which one unit is the amount of enzyme required for generation of 1 μ mol of N-acetylneuraminic acid (NANA) in 1 minute at 37°C, pH 5.0 using N-acetylneuraminyllactose (NANA-lactose) or bovine submaxillary mucin as a substrate (Cassidy J.T. *et al. J. Biol. Chem.* 240: 3501 (1965)). NA is called sialidase in some cases.

Herein, NA derived from a Gram-positive bacterium refers to NA possessed in the Gram-positive bacterium, or a structural equivalent to it, or an altered form of those. For example, NA derived from a Gram-positive bacterium includes NA that can be obtained from a Gram-positive bacterium. For example, it includes NA purified from a Gram-positive bacterium culture, or its recombinant form. A recombinant form of NA from a Gram-positive bacterium may be produced by expressing a gene encoding NA in the same or different kind of organism. NA derived from a Gram-positive bacterium includes those obtained from other source material(s), so long as they are equivalent to the NA protein obtained from the Gram-positive bacterium. In addition, NA derived from a Gram-positive bacterium includes a protein that is

modified, in which one or more amino acids are deleted, substituted, and/or inserted into the wild-type NA from the Gram-positive bacterium, so long as the modified protein retains NA activity,. The number of altered amino acids is not limited so long as the NA activity is retained, but it is preferably 70 amino acids or less, more preferably 50 amino acids or less, more preferably 30 amino acids or less, more preferably 20 amino acids or less, more preferably 10 amino acids or less, more preferably 5 amino acids or less, and most preferably 3 amino acids or less. The identity of altered NA compared to the wild-type NA from a Gram-positive bacterium at amino acid sequence level is 50% or higher, preferably 60% or higher, more preferably 70% or higher, more preferably 80% or higher, more preferably 85% or higher, and most preferably 90% or higher. The identity of amino acid sequences may be determined by BLAST, for example, the algorithm developed by Karlin and Altschul (Karlin S. and Altschul S.F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268 (1990); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877 (1993)). The BLAST program may be run using default parameters. Specific procedures for such analyses are commonly known (refer to the website of BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) in NCBI (National Center for Biotechnology Information)). For example, using the blast2sequences program, a program for comparing two sequences, alignment of two sequences may be generated, and their identity may be determined (Tatiana A. *et al.* FEMS Microbiol. Lett. 174: 247-250 (1999)). Occurrence of a gap may be treated in the same way as a mismatch, and the identity, for example, compared to the entire amino acid sequence of the wild-type NA from a Gram-positive bacterium may be calculated. In altering amino acids, it is desirable to alter amino acids in a region other than the BNR (bacterial neuraminidase repeat; Pfam Accession number PF02012 (also called "the Asp box")) so that the BNR, which is important for the NA activity, is not disrupted (Roggentin P. *et al.* Glycoconj. J. 6: 349-353 (1989); Copley R.R. *et al.* Protein Sci. 10: 285-292 (2001)). It is preferable for multiple copies of BNR to exist in a repeated manner with each repeat apart from others by 40 amino acids or further. Alteration of the N- and/or C-terminal amino acids of the wild-type NA is expected to have a minimal effect on the activity, if any.

Herein, NA derived from a Gram-positive bacterium includes a partial protein of the wild type NA from a Gram-positive bacterium, having the NA activity. Such a partial protein comprises preferably 60% or more of the entire amino acid sequence of the wild-type NA of the Gram-positive bacterium in a continuous manner, more preferably 70% or more, more preferably 75% or more, more preferably 80% or more, more preferably 85% or more, and most preferably 90% or more. Furthermore, NA from a Gram-positive bacterium may include a protein having the NA activity, in which other protein(s) is attached to the wild-type NA of the Gram-positive bacterium, or its partial protein. Preparation of a partial protein or a fusion protein with other protein(s) while keeping the activity is a common practice to one skilled in the art.

Gram-positive bacterium means a bacterium or other kind of fungus that is positive by the Gram staining. Being positive by the Gram staining means generally that the bacterium is resistant to discoloring after staining in the basic staining solution (Crystal violet, for example), followed by treatment with the Lugol's solution (I₂-KI solution), and then by a brief wash with a polar solvent (alcohol, acetone, or so). By counter-staining (with safranin solution or dilute carbol-fuchsin solution, for example) after washing, Gram-negative bacteria turn red, whereas Gram-positive bacteria turn purple. Generally, Gram-positive bacteria have a relatively thick cell wall (15 to 80 nm), and many of them lack lipopolysaccharide in the outer layer. In addition, many of them are highly sensitive to lysozyme. Specific examples of Gram-positive bacteria include *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, and actinomycetes. In the present invention, NA derived from a Gram-positive bacterium is preferably NA from actinomycetes.

Actinomycetes mean bacteria of the order Actinomycetales, and other Actinobacteria. Actinomycetes belong to a group of Gram-positive bacteria. The order Actinomycetales includes the taxonomic families of Frankiaceae, Micromonosporaceae, Propionibacteriaceae, Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae, Streptosporangiaceae, Thermomonosporaceae, Corynebacteriaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiodaceae, Actinomycetaceae, Micrococcaceae, Actinosynnemataceae, Nocardiosporaceae, and Glycomycetaceae. For example, reference to NA of *Actinomyces* is found in the Accession Number L06898 (protein: AAA21932, A49227), and X62276 (protein: CAA44166) (NA of *Actinomyces viscosus*). Reference to NA of *Corynebacterium* is found in the Accession Number NC_003450 (protein: NP_600771), and AP005278 (protein: BAB98949) (NA of *Corynebacterium glutamicum*), for example. Reference to NA of *Streptomyces* is, for example, the Accession Number NC_003155 (protein: NP_823018) (*Streptomyces avermitilis*), and NC_003888 (protein: NP_630638) (*Streptomyces coelicolor*).

The neuraminidase used herein is preferably derived from a bacterium of the order Actinomycetales, more preferably from the family Micromonosporaceae, and most preferably from the genus *Micromonospora*. Bacteria of *Micromonospora* include *M. aurantiaca*, *M. brunnea*, *M. brunnescens*, *M. carbonacea*, *M. cellulolyticum*, *M. chalcea*, *M. chersinia*, *M. citrea*, *M. coerulea*, *M. echinoaurantiaca*, *M. echinobrunnea*, *M. echinosporea*, *M. floridensis*, *M. fulviviridis*, *M. fulvopurpureus*, *M. fulvoviolaceus*, *M. globosa*, *M. griseorubida*, *M. halophytica*, *M. inositolia*, *M. inyoensis*, *M. lacustris*, *M. megalomicea*, *M. melanospora*, *M. narashino*, *M. olivasterospora*, *M. peucetica*, *M. purpurea*, *M. purpureochromogenes*, *M. rhodorangea*, *M. rosaria*, *M. rosea*, *M. sagamiensis*, *M. viridifaciens*, *M. yulongensis*, and *M. zionensis*, but may not be limited thereto. A particularly favorable NA is NA from *M. viridifaciens* (ATCC 31146). The nucleotide sequence of the *M. viridifaciens* NA gene (*nedA*) is described in the Accession

number D01045 (SEQ ID NO: 1), and the amino acid sequence of encoded protein is described in Q02834 (SEQ ID NO: 2) (Sakurada K. *et al.* J. Bacteriol. 174(21): 6896-6903 (1992)).

In addition, the NA gene of another *Micromonospora* bacterium may be isolated using the NA gene of *M. viridifaciens* as a probe. For example, a nucleic acid that hybridizes with the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 and/or its complementary sequence of 30 nucleotides or longer, more preferably 50 nucleotides or longer, more preferably 100 nucleotides or longer, more preferably 150 nucleotides or longer, and most preferably its entire sequence under stringent conditions may be selected. Such nucleic acid may be identified by preparing a probe from either nucleic acid comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, or the target nucleic acid in hybridization, and detecting hybridization of the probe to the other nucleic acid.

Stringent conditions may be achieved by performing hybridization in a solution containing 5x SSC (1x SSC: 150 mM NaCl and 15 mM sodium citrate), 7% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate), 100 µg/ml of denatured salmon sperm DNA, and 5x Denhardt's solution (1x Denhardt's: 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% bovine serum albumin, and 0.2% Ficoll) at 48°C, preferably at 50°C, more preferably at 55°C, and most preferably at 60°C, followed by washing with agitation in 2x SSC, 0.1% (w/v) SDS for 2 hours at the same temperature used for hybridization. More preferably, washing may be carried out for 2 hours with agitation in 1x SSC, 0.1% (w/v) SDS, more preferably in 0.5x SSC, 0.1% (w/v) SDS, and most preferably in 0.1x SSC, 0.1% (w/v) SDS.

In the method of producing virus of the present invention, virus producing cells are cultured in the presence of NA derived from Gram-positive bacteria as described above, and the produced virus is collected from the culture. As the virus is released from the cells into the culture medium, it can be recovered by collecting the culture supernatant. In producing a pseudotyped virus of a sialic acid binding protein, cells expressing the protein are cultured in the presence of NA from a Gram-positive bacterium for virus production, and the produced virus is recovered. NA from a Gram-positive bacterium may be supplied by its addition to the culture medium, or may be secreted from virus producing cells, or other cells co-cultured with the virus producing cells, using an expression vector of the NA. NA must be present for at least a portion of the time during which the virus producing cells are cultured. The duration in which the virus producing cells are cultured in the presence of NA may be 1 hour or longer, for example, preferably 3 hours or longer, more preferably 5 hours or longer, more preferably 10 hours or longer, and most preferably 20 hours or longer. Preferably, the virus producing cells are cultured in the presence of NA from a Gram-positive bacterium for 1 hour or longer before recovering the produced virus from the culture, more preferably 3 hours or longer, more preferably 5 hours or longer, more preferably 10 hours or longer, and most preferably 20 hours or longer. During the time, viruses accumulate in the culture supernatant.

The amount of neuraminidase from a Gram-positive bacterium in the culture may be adjusted appropriately for the maximal virus production. The concentration of NA from a Gram-positive bacterium in the culture medium is, for example, 0.1 mU/ml to 1000 U/ml, preferably 0.2 mU/ml to 500 U/ml, more preferably 0.5 mU/ml to 100 U/ml, and most preferably 1 mU/ml to 50 U/ml. In particular, NA from a Gram-positive bacterium is excellent because it is capable of producing a virus having a sufficient titer even at 10 U/ml or lower. For example, it is capable of releasing high titer virus from virus producing cells at a low concentration, such as 1 U/ml or lower, 0.1 U/ml or lower, 0.05 U/ml or lower, or 0.01 U/ml or lower.

A viral vector produced using the method of this invention may contain another protein in the envelope, in addition to a sialic acid binding protein as described above. For example, in addition to an envelope protein having the HA activity, such as an HA (or HN) protein of a negative strand RNA virus, another envelope protein participating in membrane fusion such as an F protein of a negative strand RNA virus may be further included. Moreover, an envelope protein derived from a desired virus may be further included. For example, an envelope protein derived from a virus capable of infecting human cells may be suitably used. Such a protein is not limited to any specific one; it includes an amphotropic envelope protein of retrovirus, and a G protein of vesicular stomatitis virus (VSV). In addition, it includes the herpes virus proteins such as the gB, gD, gH, and gp85 proteins of the Herpes Simplex virus, and the gp350 and gp220 proteins of the EB virus, for example. It also includes Hepadnavirus proteins, such as the S protein of the Hepatitis B virus.

For example, a vector comprising a retroviral amphotropic envelope protein (amphotropic env) and an HA (or HN) protein of a negative strand RNA virus may be produced according to the method of this invention. In addition, a virus produced by the method of the invention may comprise the VSV-G protein, a glycoprotein on the surface of vesicular stomatitis virus (VSV), for example. VSV-G is thought to bind to phospholipids present in most animal cells as the receptor. Thus, the use of a vector comprising a VSV-G protein and a sialic acid binding protein dramatically increases the types of cells amenable to gene transfection, and improves transfection efficiency as well (WO01/92508). An example of such is a vector containing a VSV-G protein and an HA (or HN) protein of a negative strand RNA virus. Such vectors may further contain an F protein of a negative strand RNA virus. Thus, the present invention is useful for production of a vector containing a retroviral amphotropic envelope protein, an F protein, and an HA (or HN) protein, and a vector containing a VSV-G protein, an F protein, and an HA (or HN) protein. Furthermore, such vectors may contain an M protein of a negative strand RNA virus. Thus, the present invention is suitably used for production of a vector containing a retroviral amphotropic envelope protein, an F protein, an HA (or HN) protein, and an M protein, and a vector containing a VSV-G protein, an F protein, an HA (or HN) protein,

and an M protein. Such a vector as described above is excellent in providing a highly efficient gene transfection into cells that have been difficult to introduce genes by conventional methods, such as mucous cells, cellular fractions containing hematopoietic stem cells, and the like. In addition, because the VSV-G protein is present on the membrane as a stable trimer formed by a single glycoprotein, such a vector particle is less prone to disruption during purification steps, and thus, it is possible to concentrate it highly by centrifugation (Yang Y. *et al.* Hum. Gene Ther. 6(9): 1203-1213 (Sep. 1995)).

The HA (or HN), F, and M proteins of a negative strand RNA virus used for producing a pseudotyped virus are not limited to any specific ones. In particular, proteins of a virus of Orthomyxoviridae, and Paramyxoviridae may be suitably used. Specifically, for example, the envelope proteins of influenza virus and Sendai virus may be suitably used. For example, a pseudotyped virus produced using an HA protein of an influenza virus expressed in virus producing cells will be capable of infecting a broad range of mammalian cells including human cells. The HA (or HN), F, and M proteins of a negative strand RNA virus and such may be prepared from a desired virus strain. For example, proteins of a pathogenic virus may be derived from an attenuated strain or boosted strain. For example, the HN, F, and M proteins of Sendai virus may be derived from the Z strain. Similarly, the envelope proteins of influenza virus may be derived from a desired isolated strain.

In addition, a retroviral amphotropic envelope protein may be derived from Murine leukemia virus (MuLV) 4070A strain. The envelope proteins of MuLV 10A1 strain may be used as well (for example, pCL-10A1 (Imgenex)) (Naviaux R.K. *et al.* J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)). Ecotropic envelope proteins may be derived from Moloney murine leukemia virus (MoMuLV). VSV-G protein may be derived from the Indiana serotype strain (J. Virol. 39: 519-528 (1981)), for example. Furthermore, proteins derived from any desired strain may be used as well.

The above envelope proteins, such as the HA (or HN), F, G, and M proteins of a negative strand RNA virus or retroviral envelope proteins, may comprise intact proteins expressed in the wild-type virus, or may contain a naturally-occurring or artificially introduced mutation(s). For example, it is possible to analyze envelope proteins for epitopes that might become cell surface antigen molecules. Then, using the information, a protein with attenuated antigenicity may be selected for virus production.

For example, it is possible to produce a vector having higher gene transfection efficiency by making a pseudotyped viral vector using a protein in which the cytoplasmic domain of a viral envelope protein that binds to sialic acid, such as HA or HN protein, or other envelope protein(s) is altered by deletion, substitution, and/or addition. Thus, the present invention relates to a method of producing a pseudotyped viral vector comprising a protein in which a part or the entire region of the cytoplasmic domain of a naturally occurring membrane protein that binds to sialic

acid is altered by deletion, substitution, and/or addition. Specifically, an altered protein, such as those in which the cytoplasmic region of the HA (or HN) and/or F proteins of a negative strand RNA virus is deleted, or substituted or attached by the cytoplasmic region of other membrane proteins (for example, envelope proteins of retroviruses including Lentivirus), may be suitably used for production of a viral vector having high infectivity. Particularly, a protein in which the cytoplasmic region of a viral envelope protein that binds to sialic acid is altered by substitution, deletion, and/or addition to the wild-type protein may be used for production of a pseudotype viral vector with increased infectivity. For example, substitution or attachment of the cytoplasmic region of a retroviral envelope protein may be suitable for producing a retroviral vector.

Specifically, by making a pseudotyped retrovirus using a protein in which the cytoplasmic region of an HA (or HN) protein of a negative strand RNA virus is substituted with that of an envelope protein of a retrovirus or Lentivirus such as SIV, and a protein in which HA (or HN) protein of a negative strand RNA virus is attached with the cytoplasmic region of an envelope protein of a retrovirus such as Lentivirus, it is possible to transfer a foreign gene at high efficiency into a broad range of cells including human cells. The length of the deleted cytoplasmic region, and the length of the attached cytoplasmic region of a retroviral envelope protein, are not limited in particular; all or part of the cytoplasmic region may be deleted, substituted, and/or attached.

Such viral vectors as above may further comprise an altered F protein of a negative strand RNA virus. For example, a protein in which the cytoplasmic region of an F protein of a negative strand RNA virus is deleted, and a protein in which the above deleted F protein is attached with the cytoplasmic region of an envelope protein of a retrovirus or lentivirus, such as SIV, may be used. Specifically, a plasmid may be constructed for expressing a protein in which amino acids in the cytoplasmic region of the F protein are deleted, for example. The length of the deletion is not limited in particular; all or part of the cytoplasmic region may be deleted. For example, the F protein in which the cytoplasmic region is deleted, leaving zero to a few amino acids, is considered suitable for producing a pseudotyped retrovirus. Such a deleted F protein may be attached to all or part of the cytoplasmic region of an envelope protein of other virus (Lentivirus envelope protein, for example), and used for virus production as a protein in which the cytoplasmic region of F protein is substituted with other peptide. An example of such proteins may be a protein attached with 11 amino acids from the 5'-side of the cytoplasmic region of SIV envelope protein. Thus, the present invention also relates to a method of producing a pseudotyped virus, further using an F protein of a negative strand RNA virus, in which all or part of the naturally-occurring cytoplasmic region of the protein is altered by substitution, deletion, and/or attachment. In particular, the present invention further relates to a method of producing a

pseudotyped virus, comprising further a protein in which the cytoplasmic region of the F protein is substituted with a part or the entire of the cytoplasmic region of an envelope protein of a retrovirus including Lentivirus.

Furthermore, the extracellular domain of a viral envelope protein may be substituted with a membrane protein having the cell adhering activity, a protein such as adhesion molecule, ligand, or receptor, or antibody or its fragment to create a chimeric protein. Such chimeric proteins may be used for producing a vector capable of infecting a broad range of tissues or a specific tissue as its target.

The method of the present invention is particularly suited for production of a retroviral vector. A retrovirus is a virus having a genome of a (+) sense strand RNA, containing reverse transcriptase characteristically. It converts its RNA genome into DNA using reverse transcriptase upon infecting a target cell, and integrates into the chromosomes of the target cell. Such viruses are collectively called "retroviruses". Herein, the retrovirus may be an altered form of the wild-type retrovirus. Such an altered form of virus should comprise at least a part of the retroviral genome RNA in the RNA contained in the viral particles, and exist as an infectious viral particle generated by the incorporation of the RNA in a sequence dependent manner through the action of retroviral proteins during viral particle formation. More specifically, the genome RNA of a retrovirus preferably comprises a packaging signal sequence essential for the incorporation into viral particles. Transcription of an RNA having an LTR on each end, comprising such signal sequence, in the presence of retroviral proteins leads to the formation of viral particles containing the RNA.

Herein, retroviral vectors include those derived from oncovirus. The term "oncovirus" refers to a retrovirus belonging to the subfamily Oncovirus. Oncoviruses include retroviruses related to tumorigenesis, such as sarcoma virus, leukemia virus, and mammary tumor virus. For example, Moloney murine leukemia virus (MoMLV) is one of the earliest developed retroviral vectors, which has been modified by many improvements, and widely used. The method of this invention may be suitably used for producing a pseudotype viral vector of MoMLV using a sialic acid binding protein such as HA (or HN) protein of a negative strand RNA virus. In addition, Murine stem cell virus (MSCV) is suitably used as a vector for gene transfer into blood cells, hematopoietic cells, and embryonic stem cells, in particular. For example, using a pseudotype MSCV prepared with an envelope protein of a negative strand RNA virus, having the HA activity, it is possible to introduce a gene into CD34 positive cells from bone marrow including hematopoietic stem cells at high efficiency.

Herein, the retroviral vector also includes those derived from lentivirus. The term "lentivirus" refers to a retrovirus belonging to the lentivirus subfamily (Lentivirus). Examples of lentiviruses include human immunodeficiency virus (HIV) (*e.g.*, HIV1 or HIV2), simian immunodeficiency

virus (SIV), feline immunodeficiency virus (FIV), Maedi-Visna virus, equine infectious anemia virus (EIAV), caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV), etc. The retroviral vector can be derived from a desired strain or subtype. For example, HIV-1 includes those of every major (M) subtype (including A to J), N, and outlier (O) (Hu, D. J. *et al.*, JAMA 1996; 275: 210-216; Zhu, T. *et al.*, Nature 1998, 5; 391(6667): 594-7; Simon, F. *et al.*, Nat. Med. 1998, 4(9): 1032-7). Isolated SIV strains include, for example, SIVagm, SIVcpz, SIVmac, SIVmnd, SIVsnm, SIVsyk, etc.

An advantage of lentiviruses is that they are infectious to nondividing cells and the viral genome can be integrated into host cell chromosome. The nuclear translocation signals and integrases encoded by gag and vpr are believed to be responsible for the integration. When, using this characteristic, a viral vector is constructed based on a lentivirus according to the present invention, genes can be introduced into nondividing cells in living tissues and cells that hardly divide, such as stem cells in various tissues, which allows for the efficient production of vectors capable of long-term gene expression.

Human immunodeficiency virus (HIV), before any other lentivirus, was used to construct a vector, which can also be used preferably in the method of the present invention. In addition, vectors have been developed based on simian immunodeficiency virus (SIV), feline immunodeficiency virus (FIV) (Poeschla, E. M. *et al.*, Nature Medicine, 4(3), 354-7, 1998), caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) (Mselli-Lakhal, L. *et al.*, Arch. Virol., 143(4), 681-95, 1998), equine infectious anemia virus (EIAV), and bovine immunodeficiency virus (BIV). The method of the present invention can be applied to the production of these vectors.

Simian immunodeficiency virus (SIV) was discovered as a monkey-derived HIV-like virus, which, along with HIV, forms the group of primate lentivirus (E. Ido and M. Hayamizu, "Gene, Infection and Pathogenicity of Simian Immunodeficiency Virus", Protein, Nucleic acid and Enzyme, Vol.39, No.8, 1994). This group is further divided roughly into four subgroups: (1) HIV-1 subgroup containing HIV-1 that is the causative virus for human acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and SIVcpz isolated from chimpanzee; (2) HIV-2 subgroup containing SIVsmm isolated from Sooty Mangabey (*Cercocebus atys*), SIVmac isolated from rhesus monkey (*Macaca mulatta*), and HIV-2 that is less pathogenic in human (Jaffar, S. *et al.*, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol., 16(5), 327-32, 1997); (3) SIVagm subgroup represented by SIVagm isolated from African green monkey (*Cercopithecus aethiops*); and (4) SIVmnd subgroup represented by SIVmnd isolated from Mandrill (*Papio sphinx*).

There is no report suggesting the pathogenicity of SIVagm and SIVmnd in natural hosts (Ohta, Y. *et al.*, Int. J. Cancer, 15, 41(1), 115-22, 1988; Miura, T. *et al.*, J. Med. Primatol., 18(3-4), 255-9, 1989; M. Hayamizu, Nippon Rinsho, 47, 1, 1989). In particular, previous reports describe that, according to the results of infection experiments, the TYO-1 strain, which is one of the SIVagm

subgroup, and was also used herein in the Examples, is not pathogenic in crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*), rhesus monkey (*Macaca mulatta*) or in other natural hosts (Ali, M. *et al.*, Gene Therapy, 1(6), 367-84, 1994; Honjo, S *et al.*, J. Med. Primatol., 19(1), 9-20, 1990). There is no report of SIVagm infection to humans and the onset thereof, and thus it is believed that SIVagm may not be pathogenic to human. In general, lentiviruses in primates have strict species-specificity, and there are few reports of cases of cross-species infection with SIVagm from natural hosts and onset thereof; if any, normally the onset frequency is low and the disease progresses slowly (Novembre, F. J. *et al.*, J. Virol., 71(5), 4086-91, 1997). Accordingly, a viral vector prepared based on SIVagm, particularly SIVagm TYO-1, is thought to be safer than vectors based on HIV-1 or other lentiviruses, and thus it is a preferred virus produced in the present invention.

Furthermore, in the present invention, the retroviral vector includes those derived from spumavirus. The spumavirus includes, for example, foamyvirus (DE4318387; WO9607749; Virology (1995) 210, 1, 167-178; J. Virol. (1996) 70, 1, 217-22). Vectors derived from foamyvirus can be utilized for introducing foreign genes into human cells, particularly in gene therapy and administration of recombinant vaccines.

In the present invention, the retroviral vector may be modified in the LTR (long terminal repeat). The LTR is a retrovirus-specific sequence which is present in the viral genome at both ends. The 5' LTR serves as a promoter, which enhances the mRNA transcription from the provirus. Thus, a substitution of the portion exhibiting the 5' LTR promoter activity in the vector (herein referred to as gene transfer vector) that expresses RNA to be incorporated into viral vectors with another promoter having stronger promoter activity can lead to increased levels of mRNA transcription of the gene transfer vector, which may improve the packaging efficiency and thus increase the vector titer. Furthermore, for example, in the case of lentivirus, the transcription activity of 5' LTR is known to be enhanced by viral tat protein, and, therefore, substitution of the tat protein-independent promoter for the 5' LTR allows for the exclusion of tat from the vector that expresses viral genes required for viral packaging (herein referred to as packaging vector). The intracellular RNA of virus infected to cells is reverse transcribed and forms a closed circular structure with a linkage between the LTRs at the two ends, and then integrated into the chromosome of cells through the interaction between the linkage site and viral integrase. The mRNA transcribed from the provirus corresponds to the region from the transcription initiation site in the 5' LTR to the 3' LTR polyA sequence that located downstream; the 5' LTR promoter portion is not packaged in the viral particle. Thus, even if the promoter is replaced with another sequence, the portion that is integrated into the chromosome of target cells has no alteration. Based on the facts described above, a substitution of 5' LTR promoter can provide a safer vector with a higher titer. Thus, a substitution of the promoter at the 5' end in a

gene transfer vector can increase the titer of packagable vectors.

The safety can be improved with a self inactivating vector (SIN vector) which is prepared by partially eliminating the 3' LTR sequence to prevent the transcription of full-length vector mRNA in target cells thereof. The provirus for lentivirus, which is integrated into the chromosome of target cells, has the U3 portion of 3' LTR attached to the 5' end thereof. Thus, in the chromosome of target cells, the gene transfer vector contains U3 at the 5' end and accordingly the transcription of RNA covering the whole gene transfer vector starts there. If there were lentivirus or related proteins in the target cells, the gene transfer vector would be re-packaged and infect other cells. Furthermore, there is a possibility that a host gene located adjacent to the 3' end of viral genome may be expressed by the 3' LTR promoter (Rosenberg, N., Jolicoeur, P., Retroviral Pathogenesis. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 475-585, 1997). Such events are recognized as being problematic with retroviral vectors. Thus, the SIN vector was developed as a solution to overcome the problems (Yu, S. F. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 83(10), 3194-8, 1986). When the U3 portion is deleted from the 3' LTR in the gene transfer vector, neither 5' LTR nor 3' LTR promoter is present in the target cells. In such cases, neither full-length viral RNA nor host gene is transcribed, while the transcription of genes of interest is achieved with internal promoters; such a vector can be an overexpression vector with higher safety. Such vectors can also be produced according to the method of this invention. The gene transfer vectors for producing SIN vectors can be constructed according to any of methods known in the art (WO01/92508).

Retroviruses can be produced by transcribing a gene transfer vector DNA containing the packaging signal in host cells, and allowing viral particles formation in the presence of gag and pol proteins, and envelope proteins. The gene transfer vector DNA may be a DNA vector such as plasmid, or a DNA that has been integrated in the chromosome of packaging cells. While it is preferable to integrate the packaging signal sequence encoded by the gene transfer vector DNA so long as possible to maintain the structure formed based on the sequence, it is required to minimize the sequence homologous between the packaging signal in the vector DNA and another packaging vector for providing gag and pol proteins to reduce the frequency of wild-type virus formation due to recombination between the types of vectors. Accordingly, it is preferable to construct the gene transfer vector DNA using as short a sequence as possible comprising the sequence required for packaging to meet both criteria of packaging efficiency and safety.

There is no limitation on the type of packaging signal, so long as packaging is achieved in cells where the packaging vector has been introduced; those derived from retrovirus, lentivirus, immunodeficiency virus, and the like can be used depending on the type of packaging vector.

For example, in the case of SIVagm-derived packaging vector, the type of virus from which the signal sequence to be used is derived is limited to SIV because HIV vectors are not packaged.

However, the SIV-derived gene transfer vector is also packagable when an HIV-derived packaging vector is used. Thus, the frequency of recombinant virus formation can be reduced when the vector particles are formed by combining gene transfer vector and packaging vector, each derived from different type of lentivirus. In such cases, it is preferred to use combinations of lentiviruses in primates (for example, HIV and SIV).

In a preferred gene transfer vector DNA, gag protein has been modified so that it is not expressed. The viral gag protein can be detected as a foreign substance in the living body, and thus a potential antigen. Alternatively, the protein may affect cellular functions. To prevent the gag protein expression, frameshift mutations can be introduced for modification by adding or deleting nucleotides downstream of the start codon of gag. It is also preferable to delete portions of the coding region of gag protein. In general, a 5' portion of the coding region of the gag protein is known to be essential for viral packaging. Thus, in a gene transfer vector, it is preferred that the coding region for the gag protein be deleted at the C terminus. It is preferred to delete as large a portion of gag coding region as possible, so long as the deletion does not considerably affect the packaging efficiency. In addition, it is preferred to replace the start codon (ATG) of gag protein with a codon other than ATG. Such a codon for the replacement can be selected appropriately not to greatly affect the packaging efficiency. A viral vector containing the transcription product of gene transfer vector DNA can be produced by introducing the constructed gene transfer vector DNA comprising the packaging signal into appropriate packaging cells. The viral vector particles produced can be recovered from the culture supernatant of packaging cells, or the like.

There is no limitation on the type of packaging cell to be used, so long as the cell line is generally used in viral production. When used for the purposes of gene therapy in human, a human or monkey-derived cell is preferred. Human cell lines to be used as packaging cells include, for example, 293 cell, 293T cell, 293EBNA cell, SW480 cell, u87MG cell, HOS cell, C8166 cell, MT-4 cell, Molt-4 cell, HeLa cell, HT1080 cell, TE671 cell, etc. Monkey cell lines include, for example, COS1 cell, COS7 cell, CV-1 cell, BMT10 cell, etc. In addition, previously established packaging cells can be used. Such packaging cells include, for example, Bosc23 cell, PE501 cell, etc.

There is no limitation on the type of foreign gene to be inserted in the vector, which include, for example, nucleic acids which do not encode any protein, such as antisense or ribozyme sequences, as well as protein-encoding nucleic acids.

In recent years, attention has been given to a variety of stem cells, including hematopoietic stem cells, as targets of gene therapy (Y. Hanazono, *Molecular Medicine*, Vol. 36, No. 7, 1999). A pseudotyped retroviral vector comprising an envelope protein having the hemagglutinin activity of a negative strand RNA virus can transfer genes into CD34-positive cells

derived from human bone marrow with high efficiency (WO01/92508); such a fraction comprising the CD34-positive cells receives attention as a cell fraction containing hematopoietic stem cells in recent years. Previous reports describe that the CD34-positive cells exhibit pluripotency in colony assay using a culture medium containing methylcellulose (Kirshenbaum, A. S. *et al.*, J. Immunol., 148(3), 772-7, 1992) and that transplantation of CD34-positive cells into NOD/SCID mouse that is a compounded immunodeficiency strain leads to localization of the cells in the mouse bone marrow and reconstitution of hemopoietic system (Laroche, A. *et al.*, Nat. Med., 2(12), 1329-37, 1996). Hence, it is thought that stem cell-like immature cells are present in at least the CD34-positive cell fraction. The hematopoietic stem cells in the CD34-positive cell fraction are in nondividing state. In general, when a retroviral vector is used, the efficiency of gene transfer into such cells is low (Kiem, H. P. *et al.*, Curr. Opin. Oncol., 7(2), 107-14, 1995.); however, the infection efficiency can be greatly improved by using a pseudotyped vector comprising an envelope protein having the hemagglutinin activity of a negative strand RNA virus. In particular, the efficiency of gene transfer into nondividing cells is expected to further increase through the use of a lentiviral vector, such as HIV or SIV vector. The method of the present invention for producing a pseudotyped retroviral vector using a protein that binds to sialic acid is useful for production of a vector for gene transfer into blood cells or hematopoietic cells. Thus, the present invention relates to a method for producing a vector for gene transfer into blood cells or hematopoietic cells using the method of the invention for virus production. It also relates to a method of gene transfer into blood cells or hematopoietic cells, comprising a step of contacting the blood cells or hematopoietic cells with a vector produced using the method of this invention, and use of the vector produced by the method for gene transfer into blood cells or hematopoietic cells. The efficiency of transfer of a foreign gene into blood cells or hematopoietic cells may be evaluated, for example, by flow cytometry analysis using antibodies against a variety of known cell surface antigens, colony assay, and reconstitution of the hematopoietic system by transplanting hematopoietic cells into mice whose hematopoietic system is disrupted.

The retroviral vector pseudotyped by the use of proteins having sialic acid binding activity, can transfer genes into hemocytes and hematopoietic cells with high efficiency, and thus is useful in gene therapy whose target is blood cells, *e.g.*, adenosine deaminase (ADA) deficiency (Blaese, R. M., *Pediatr. Res.*, 33 (1 Suppl), S49-53, 1993), hemophilia (Kay, M. A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96(18), 9973-5, 1999) and Fanconi anemia, etc. The administration can be performed, for example, by an *ex vivo* method.

Specifically, examples of gene therapies that targets hemopoietic cells, to which the vector produced by the method of the present invention is applicable, include, for example, use of the drug resistance gene MDR1 to preserve stem cells in anti-cancer chemotherapy (Licht, T. *et al.*,

Gene Ther. (2000) 7, 4, 348-58); introduction of the normal FANCC gene for the treatment of Fanconi anemia (Liu, J. M. *et al.*, Hum. Gene Ther. (1999) 10, 14, 2337-46); introduction of a combination of cytokines (thrombopoietin, interleukins 6 and 11, and Flt-3 ligand) to enhance the *ex vivo* proliferation of stem cells (WO 99/07831); the expression of chimeric proteins, such as

5 Flt-3 agonist, to treat cytopenia (WO 98/46750); introduction of the human β globin gene to treat β thalassemia (WO 9741141); a combination therapy with IL-6 antagonist and suicide gene expression to treat IL-6-dependent multiple myeloma (German Patent No. DE19704979); introduction of genes such as receptor agonist comprising a combination of hemopoietic factors [interleukins (GM-CSF, G-CSF-Ser17, M-CSF, erythropoietin, IL-1, IL-14, IL-2, IL-5, IL-6,

10 IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, and IL-15), leukemia inhibitory factor (LIF), flt3/flk2 ligand, human somatotropin, B cell growth factor, B cell differentiation factor, erythrocyte differentiation factor (EDF) or stem cell factor (SCF)] (WO 97/12985), c-mpl receptor agonist to be used in stem cell culture and gene therapy for hemopoietic diseases (WO 97/12978), IL-6 and IL-6 soluble receptor fusion protein to be used for the proliferation of human

15 hemopoietic progenitor cells (Nat. Biotechnol. (1997) 15, 2, 142-45), IL-6 superagonist and superantagonist to be used to proliferate hemopoietic progenitor cells (WO 96/18648), Factor-X to be used in therapy for blood diseases (J. Cell. Bioche. (1995) Suppl. 21A, 410), stem cell factor, IL-6, and soluble IL-6 receptor complex to be used to proliferate human hemopoietic progenitor cells (Gene Ther. (1995) 2, 9, 694), ribozyme whose targets are RNA viruses, and

20 antisense and/or decoy RNA which are useful to prevent HIV infection and for intracellular immunity (WO 96/22368). This invention relates to methods for producing a viral vector encoding any of the above or any combination thereof, wherein the viral vector comprises a cyalic acid-binding membrane protein in its envelope.

In addition, a vector produced by the method of the present invention has a strong

25 infectivity in mucous cells, such as nasal mucoepithelial cells and lung bronchial mucoepithelial cells. Using conventional viral vectors, it is very difficult to transfer genes into mucous cells such as those in the tracheal epithelium; besides, treatment for removing physical barriers is essential. For example, gene transfer using an HIV vector of VSV-G pseudotype does not give sufficient transfection efficiency unless tissues are damaged by sulfur dioxide, or such (Johnson

30 L.G. *et al.* Gene Therapy 7: 568-574 (2000)). However, vectors produced by the method of this invention are capable of transferring genes into the mucous cells, which have been difficult to transfect, at high efficiency without damaging cells or tissues (WO01/92508). Accordingly, the present invention relates to a method of producing a vector for gene transfer into mucous cells using the method of virus production of this invention. It also relates to a method of gene

35 transfer into mucous cells, comprising a step of contacting mucous cells with a vector produced by the method of this invention, and using the vector produced by the method for gene transfer

into mucous cells. Mucous cells include mucous epithelial cells, in particular, and nasal or lung bronchial mucous epithelial cells, specifically.

Specific examples of applications include induction of the immune system by transferring genes (*e.g.*, IL-2, IFN- γ , and TGF- β) into skin and mucosa by taking advantage of antigen presenting cells (APC) present at high concentration (WO95/05853), rotaviral vaccine through oral administration of gene into mucosa (J. Virol. 72(7): 5757-5761 (1998)), mucosal administration for treatment of autoimmune disease (WO97/46253), mucosal administration for prevention of infectious disease (WO96/21356), gene transfer into female genital organ mucosa for prevention of sexually transmitted disease or cervical cancer caused by papillomavirus infection (Infect. Immun. 66(1): 322-329 (1998)), and simplified administration and increased safety obtained by mucosal administration (Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 36: 86 Meet., 418 (1995)).

Specifically, the methods of this invention, for producing a recombinant retroviral vector, comprise the steps of, for example, (a) providing cells in which a retroviral genome RNA is transcribed, and the gag and pol proteins and a membrane protein that binds to sialic acid are expressed (virus producing cells), and (b) culturing the cells in the presence of a neuraminidase derived from a Gram-positive bacterium, and recovering the produced virus. Retroviral genome RNA may be altered from the wild-type viral genome, so long as it is packaged into viral particles, and integrated into the chromosomes of target cells. For example, it may be RNA having LTR on both ends and comprising the packaging signal sequence inside. Genome RNA may be inserted with a desired gene. Such an inserted foreign gene may be expressed by the promoter activity of LTR, or expressed from another promoter by inserting the promoter inside the genome.

The gag and pol proteins expressed in virus producing cells, and the genome RNA may be derived from other viruses, so long as these are assembled to form a virus. For example, packaging cells expressing viral proteins derived from HIV may be used to package the SIV genome RNA. In such applications, a membrane protein that binds to sialic acid may be expressed in the packaging cells either transiently or constitutively. By culturing the above virus producing cells in the presence of a neuraminidase from a Gram-positive bacterium, retrovirus having a membrane protein that binds to sialic acid in the envelope is released into the culture medium. The culture or culture supernatant may be recovered to obtain the produced virus.

For example, a retroviral vector may be produced in the present invention as follows. The following specific method of producing a viral vector is shown as an example, and one skilled in the art would be able to modify it appropriately.

For expressing a viral envelope protein for pseudotyping of recombinant virus using a plasmid vector, for example, the gene encoding the protein is inserted into the pCAGGS vector (Niwa H. *et al.* Gene 108: 193-200 (1991)) and the like to construct an expression vector. The

genes encoding the HA (or HN), F, and M proteins of a negative strand RNA virus (*e.g.*, Influenza virus or Sendai virus), for example, are inserted into the expression vector. For example, for construction of an expression plasmid for HA protein from Influenza virus (H1N1), the ORF of HA protein is amplified by PCR using the pDREF HisD plasmid (Microbiol. Immunol. 44(8): 677-685 (2000)) as a template, and an appropriate primer pair. Amplified fragment is digested with NotI, and inserted into the NotI site of a vector in which pCAGGS is attached with an XhoI-NotI site. Following this, the pCAGGS-HA plasmid for expression of HA protein is obtained (WO01/92508). Alternatively, a plasmid for expression of a Sendai virus envelope protein or the like may be prepared as follows: the genes encoding F, HN, and M proteins are cut out from pSeV18⁺b(+), the entire genome DNA of Sendai virus Z strain (Hasan M.K. *et al.* J. General Virol. 78: 2813-2820 (1997)), for example, and inserted into the XhoI site of pCAGGS to construct expression vectors for F, HN, and M proteins from Sendai virus (referred to as pCAGGS F, pCAGGS HN, and pCAGGS M, respectively) (WO01/92508).

In producing a retrovirus, the human embryonic kidney derived cell line 293T cells (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8392-8396 (1993)) may be used as the virus producing cells, for example. 293T cells are cultured in Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL) containing 10% inactivated fetal bovine serum, for example. Transfection of DNA vector can be performed using LIPOFECTAMINE PLUS (Gibco BRL) or the like according to the attached manufacturer's instructions. For example, 293T cells are plated into 6-well plastic plate at a density of 1×10^6 cells/well, and cultured for 48 hours in a CO₂ gas incubator (37°C, 10% CO₂ gas). Thirty minutes before transfection, the culture medium is replaced with 800 µl of DMEM (Gibco BRL) containing 1% bovine serum albumin (Gibco BRL) per well, and then culturing is continued.

The gene transfer vector is not limited to any particular virus; for example, Murine Stem Cell Virus (MSCV; Clontech) (Hawley R.G. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 10297-10302 (1996); Hawley R.G. *et al.* Gene Therapy 1: 136-138 (1994)) may be used. A desired gene to be expressed is inserted into the vector. In terms of the amount of DNA for transfection, 700 ng of the gene transfer vector and 300 ng of the packaging vector (pCL-Eco, pCL-Ampho (MuLV 4070A), both available from IMGENEX) may be used per well (Naviaux, R. K. *et al.*, J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)), and in addition to these, 200 ng of the above expression vectors for envelope proteins of a negative strand RNA virus may be used alone or in any combination. DNA is dissolved in 100 µl of OptiMEM, to which 6 µl of PLUS reagent (Gibco BRL) is then added, and after mixing, the solution is incubated still for 15 minutes at room temperature. To the mixture of DNA and PLUS reagent (Gibco BRL), 4 µl of LIPOFECTAMINE diluted in 100 µl of OptiMEM is added, and after mixing, the mixture is incubated for additional 15 minutes at room temperature. A solution containing a complex of DNA and LIPOFECTAMINE prepared as

described above is added dropwise to the culture of 293T cells in a 6-well plate, and then mixed gently, and the culture is incubated for 3 hours in a CO₂ gas incubator (37°C, 10% CO₂ gas). Then, 1 ml of DMEM (Gibco BRL) containing 1% bovine serum albumin (Gibco BRL) and 15 µg/ml of trypsin (Gibco BRL) per well is added to the culture, and incubation is continued for additional 24 hours in a CO₂ gas incubator (37°C, 10% CO₂ gas). Subsequently, the culture medium is replaced with 2 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, 5 µg/ml of trypsin (Gibco BRL), and 0.01 U of neuraminidase from a Gram-positive bacterium for each well, and the culture is continued for additional 24 hr. Then, the culture supernatant is collected, and filtrated through a filter of a pore size 0.45 µm (*e.g.*, DISMIC-25CS filter (ADVANTEC)) to obtain vector solution. Neuraminidase from a Gram-positive bacterium may be NA derived from actinomycetes, for example, and NA from *M. viridifaciens*, specifically. The amount of NA may be appropriately adjusted. Pseudotyped retrovirus with an envelope protein of a negative strand RNA virus having the HA activity has a strong infectivity in mucous cells, such as lung bronchial mucoepithelial cells. Thus, such a vector produced as above is useful for gene transfer into mucous cells. Furthermore, such a viral vector, capable of transferring genes into both human bone marrow CD34 positive cells and CD34 negative cells, is useful for transferring genes into hematopoietic cells.

In addition, a pseudotyped retroviral vector based on Moloney murine sarcoma virus may be suitably produced in the present invention. Moreover, a vector further comprising VSV-G protein as an envelope protein may be prepared. For example, using the above pMSCV EGFP, or the pLZRNL vector expressing LacZ under the control of Moloney murine sarcoma virus-derived LTR (Yee J.-K. *et al.* Methods In Cell Biology 43: 99-112 (1994); Xu L. *et al.* Virology 171: 331-341 (1989)) as the gene transfer vector, pseudotyped retroviral vectors with a variety of envelope proteins may be prepared as described below.

293T cells (human embryonic kidney derived cell line) are cultured in high glucose DMEM (Gibco BRL) containing 10% inactivated bovine calf serum (BIO WHITTAKER) at 37°C, 10% CO₂ gas. The cells are plated into 6-well plastic plates at a density of 5x 10⁵ cells/well, and cultured for 48 hours at 37°C, 10% CO₂ gas. Then, the culture medium is replaced with 800 µl of DMEM containing 1% bovine serum albumin per well, and the cells are subjected to transfection. For each well, 700 ng of the gene transfer vector (pMSCV EGFP, or pLZRNL) is mixed with 100 ng of VSV-G expression plasmid pVSV-G (derived from the Indiana serotype strain; Clontech), 200 ng each of the expression plasmids (constructed with pCAGGS) for HA (or HN), F, and M proteins of a negative strand RNA virus, and 300 ng of the expression plasmids for murine retrovirus capsid protein, pCL-Eco, and pCL-Ampho (Imgenex) (Naviaux R.K. *et al.* J. Virol. 70: 5701-5705 (1996)) in any combination, and dissolved in 100 µl of OptiMEM. After addition of 6 µl of PLUS Reagent (Gibco BRL), the mixture is stirred, and

incubated still for 15 minutes at room temperature. To the mixture, 4 μ l of LIPOFECTAMINE Reagent (Gibco BRL) diluted in 100 μ l of OptiMEM is added and mixed well, and further incubated at room temperature for 15 min. Then, the mixture is added dropwise to the above culture of 293T cells, mixed gently, and the culture is incubated for 3 hours at 37°C, 10% CO₂ gas. Then, 1 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin and 15 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL) is added to the culture in each well, and incubation is continued for additional 24 hours at 37°C, 10% CO₂ gas. Subsequently, the culture medium of each well is replaced with 2 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, 5 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL), and 0.01 U of neuraminidase from a Gram-positive bacterium (actinomycete, for example), and the culture is continued for additional 24 hr. Then, the culture supernatant is collected, and filtrated through a filter of a pore size 0.45 μ m to obtain a vector solution.

Furthermore, this invention may be particularly useful for the production of a lentivirus vector. An example of producing a pseudotyped lentiviral vector with VSV-G protein is shown below.

For construction of vectors, the SIVagm TYO-1 strain, a nonpathogenic clone of African green monkey immunodeficiency virus, may be used, for example. Plasmids carrying the SIVagm TYO-1 as an insert may be constructed from pSA212 (J. Virol. 64: 307-312 (1990)), for example. Construction of the gene transfer vector and packaging vector may be performed using the publicly known literatures as a reference (WO01/92508). Specifically, an expression plasmid for providing essential proteins for the formation of virion, in which each of the gag, pol, tat, rev, vif, vpr/x sequence is located downstream of the promoter (packaging vector), is constructed. To avoid production of the wild-type virus, it is preferred to remove the most part of the packaging signal Ψ and env. The SD sequence and RRE sequence may be inserted upstream of gag, and downstream of the first exon of tat/rev, respectively, to express all the genes in the packaging vector. Furthermore, the entire nef sequence, which is considered non-essential for vector packaging, may be deleted.

The gene transfer vector, providing RNA that is packaged in the vector, is constructed to carry the LTR sequence of both ends of the genome, SD sequence, Ψ , and RRE as inserts. Furthermore, the 5'-LTR promoter region of the gene transfer vector may be substituted with a foreign promoter. Furthermore, the sequence of 3'-LTR may be partially deleted to prepare a Self Inactivating Vector (SIN vector) that prevents transcription of mRNA encoding the entire vector in target cells. For such SIN vector, the CMV promoter may be inserted as the promoter, for example, and a desired foreign gene is inserted downstream of it.

VSV-G expression vectors can be used as vectors that provide capsid proteins to form pseudotyped vector particles. For example, the vector used to provide VSV-G may be the field-proven pVSV-G in pseudotyping retroviral and HIV vectors (Burns, J. C. (1993) Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 90: 8033-8037).

More specific description is provided below.

<Construction of packaging vectors>

A DNA fragment corresponding to the region (5337 to 5770) containing *vif* and the first exon of *tat/rev* is prepared by PCR using an appropriate pair of primers and pSA212 as a template. A site for the restriction enzyme *EcoRI* is added to one of the PCR primers, and thus the prepared DNA fragment contains an *EcoRI* site at its 3' end. The PCR fragment is digested with *BglII* and *EcoRI*, and purified by using agarose gel electrophoresis and Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega). The DNA fragment prepared as described above and another DNA fragment encoding the *gag/pol* region (from *XhoI* site (356) to *BglII* site (5338)) are ligated into pBluescript KS+ (Stratagene) between the *XhoI* and *EcoRI* sites. Then, a Rev responsive element (RRE) and a DNA fragment corresponding to the region containing the second exon (6964 to 7993) of *tat/rev* are amplified by PCR. A *NotI* site is added to the 3' end by PCR using, for example, pSA212 as a template. The resulting PCR fragment is double-digested with *EcoRI* and *NotI*, followed by purification. The fragment is inserted into pBluescript KS+ containing *gag-tat/rev* between the *EcoRI* and *NotI* sites.

A DNA fragment comprising a sequence for splicing donor (SD) site, which is synthesized to have an *XhoI* site and *Sall* site at 5' and 3' ends, respectively, is inserted at the *XhoI* site of the above-described pBluescript KS+ containing *gag-RRE-tat/rev*. The resulting plasmid is digested with *XhoI* and *NotI*. The fragment containing SD-*gag-RRE-tat/rev* is purified. A plasmid is prepared by inserting an *XhoI/NotI* linker into pCAGGS (Gene, vol.108, pp.193-200, 1991) at the *EcoRI* site, and then the above-mentioned SD- *gag-RRE-tat/rev* fragment is inserted at the *XhoI-NotI* site. The plasmid obtained by the method as described above is used as the packaging vector pCAGGS/SIVagm *gag-tat/rev* (WO01/92508).

<Construction of gene transfer vectors>

Using pSA212 as a template, PCR is carried out to amplify the SIVagm TYO1-derived 5' LTR region (8547 to 9053 + 1 to 982; containing *KpnI* site and *EcoRI* site at the 5' and 3' ends, respectively); the 3' LTR region (8521 to 9170; containing *NotI* and *BamHI* sites at the 5' end and *SacI* site at the 3' end); and the RRE sequence (7380 to 7993; containing *EcoRI* and *SacII* sites at the 5' and 3' ends, respectively), using appropriate pairs of primers. The CMV promoter region (1 to 600; containing *SacII* and *NotI* sites at the 5' and 3' ends, respectively) derived from pEGFPN2 (Clontech) is amplified using an appropriate pair of primers. The DNA fragments are digested at their ends. After purification, the 5' LTR, RRE, CMV promoter, and 3' LTR are inserted in this order into pBluescript KS+ at the *KpnI-SacI* site by ligation. For example, a *NotI* fragment containing the β -galactosidase gene derived from pCMV β (Clontech) is inserted as a reporter gene into the *NotI* site. The resulting plasmid is digested with *KpnI* and *SacI* to obtain a

DNA fragment containing the region from the 5' LTR to the 3' LTR. The fragment is inserted into a control vector pGL3 (Promega) at the KpnI-SacI site. The resulting plasmid is used as the gene transfer vector pGL3C/5' LTR.U3G2 /RREc/s/CMV F β -gal/WT 3' LTR.

Further, the CMV promoter region derived from pEGFPC2 (Clontech) and the region encoding EGFP (1 to 1330; containing a SacII site at the 5' end and NotI, BamHI sites, and translational stop codon at the 3' end) are amplified by PCR using an appropriate pair of primers and using pEGFPC2 as a template. The four types of PCR fragments are digested with restriction enzymes KpnI and EcoRI, EcoRI and SacII, BamHI and SacI, and SacII and BamHI, respectively. After being purified, the fragments of 5' LTR, RRE, CMV promoter EGFP, and 3' LTR are inserted in this order into pBluescript KS+ between KpnI and SacI by ligation (pBS/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3'LTR). The plasmid pBS/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3'LTR is digested with KpnI and SacI to prepare a DNA fragment containing the region from the 5'LTR to the 3'LTR. The fragment is inserted into pGL3 (Promega) as a control vector at the KpnI-SacI site to construct a vector (pGL3C/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3'LTR).

<Modification of 5' LTR>

A fragment containing gag region (9039 to 9170 + 1 to 982) downstream of the TATA box of 5' LTR is amplified by PCR using an appropriate pair of primers and using pSA212 as a template. The CMV L promoter of cytomegalovirus (derived from pCI (Promega); nucleotides 1 to 721) is amplified by PCR. A fragment containing a region downstream of the TATA box of 5' LTR is combined with the fragment containing the promoter. A DNA fragment containing a chimeric promoter of the promoter and the 5' LTR is prepared by PCR using the mixture as a template and a primer placed on the 5' side of the promoter and another primer located on the 3' side of 5' LTR. The resulting DNA fragment is inserted into the gene transfer vector (pGL3C/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3'LTR) at the KpnI-EcoRI site to prepare pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3'LTR. Similarly, the DNA fragment obtained by the PCR experiment described above is also inserted into the vector pGL3C/5'LTR.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3'LTR at the KpnI-EcoRI site to prepare pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3'LTR.

<Preparation of 3' LTR-modified SIN vector (self inactivating vector)>

A DNA fragment containing the 27 bp at the 5' end, 15 bp at the 3' end, and R region from the U3 region of 3' LTR is amplified by PCR using an appropriate pair of primers and using pSA212 as a template. This fragment is inserted into the Sall-SacI site of the gene transfer vector pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/WT3'LTR, which is prepared to contain the chimeric promoter in the above Section, to prepare pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF β -gal/3'LTR Δ U3. Similarly, this fragment is also inserted

into pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/WT3'LTR at the Sall-SacI site to prepare pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTRΔU3 (WO01/92508).

The constructed plasmid is transformed into DH5α (Toyobo) by the conventional method, and incubated in agar plates. PCR is carried out using the emerging colonies as templates to confirm the correct structure. Clones confirmed are cultured in 100 ml of LB culture medium. The plasmids are purified with a QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN).

<Recovery of viral vector>

293T cells are plated into 6-well plastic plates at a density of 5×10^5 cells/well, and cultured for 48 hours at 37°C, 10% CO₂ gas. Then, the culture medium is replaced with 800 μl of OptiMEM (containing 1% BSA if HA is used) per well for the use in transfection. For each well, 600 ng of the above gene transfer vector and 300 ng of the above packaging vector are mixed with expression plasmids for envelope proteins, such as 100 to 300 ng of expression plasmids for HA (or HN) and F proteins of a negative strand RNA virus (constructed in pCAGGS), and 100 ng of the expression plasmid for the VSV-G protein (pVSV-G; Clontech), in any combination, and dissolved in 100 μl of OptiMEM. After addition of 6 μl of PLUS Reagent (Gibco BRL), the mixture is stirred, and incubated still for 15 minutes at room temperature. To the mixture, 100 μl of OptiMEM mixed with 4 μl of LIPOFECTAMINE reagent (Gibco BRL) is added, mixed well, and incubated for additional 15 minutes at room temperature. Then, the mixture is added dropwise to the above culture of 293T cells, mixed gently, and incubated for 3 hours at 37°C, 10% CO₂. Then, 1 ml of DMEM containing 20% inactivated bovine serum (or containing 1% BSA and 5 μg/ml of trypsin instead if HA is used) is added to the culture of each well, and the culture is continued for additional 12 hours at 37°C, 10% CO₂ gas. Subsequently, the culture medium of each well is replaced with 2 ml of DMEM containing 10% inactivated bovine serum (or containing 1% bovine serum albumin and 5 μg/ml of trypsin, instead, with the presence of NA derived from *M. viridifaciens* if HA is used), and the culture is continued for 24 hr. Then, the culture supernatant is recovered, and filtrated through a filter with a pore size 0.45 μm.

<SIVagm vector-mediated gene transfer>

293T cells are plated in a 6-well plastic culture plate at a cell density of 5×10^5 cells/well, and incubated under 10% CO₂ at 37°C for 48 hours. The culture medium is removed, and 1 ml of the solution containing the vector solution to which polybrene (Sigma) is added at a final concentration of 8 μg/ml is overlaid onto the cells. The cells are incubated under 10% CO₂ at 37°C for 3 hours to achieve vector transfect. After three hours, 1 ml of the culture medium is added to the cells. On the following day, the culture medium is changed. Next day, when the vector used is the β-Gal expression vector, staining is carried out using X-gal as the substrate with a β-Gal Staining Kit (Invitrogen), and the expression of β-galactosidase in the target cells is observed under a light microscope. However, when the vector used is the EGFP expression

vector, the expression is analyzed under a fluorescence microscope.

<Vector titration>

Vector titration is carried out by calculating the number of cells into which a gene is introduced using 1 ml of the vector solution. 293T cells are plated in a 6-well plastic culture plate at a cell density of 1×10^6 cells/plate, and incubated for 48 to 72 hours. By the same procedure as described above, infection to the cells is carried out with serially diluted vector solutions. X-gal staining is performed 48 hours after infection. For example, the mean value for the number of cells containing the transferred gene in a visual field is determined from three different visual fields under a light microscope with 200-fold magnification, and multiplied by the coefficient 854.865 that has been determined based on the area of the visual field and the area of the plate to determine the titer. The unit of titer of viral vector thus calculated is defined as Transducing Unit (T.U.)/ml.

The SIVagm vector thus prepared mediates gene transfer into culture cells and other *in vivo* and *ex vivo* cells highly efficiently. The probability of reconstitution of wild-type viral particles is assumed to be very low in vector packaging after co-transfection of a number of independent plasmids, such as the above-described gene transfer vector, packaging vector, and envelope expression vector. Furthermore, SIVagm TYO-1 itself, used as a base for the vector, has been confirmed to exhibit no pathogenicity in terms of both natural and experiment infection (Ohta, Y. *et al.*, Int. J. Cancer: 41, 115-22, 1988; Miura, T. *et al.*, J. Med. Primatol.: 18(3-4), 255-9. 1989; Honjo, S. *et al.*, J. Med. Primatol. 19(1), 9-20, 1990). In addition, the vector can be highly safe because generally lentiviruses are highly species-specific and have only weak pathogenicity to animal species other than their original target species (Novembre, F. J. *et al.*, J. Virol.: 71(5), 4086-91. 1997).

In this vector producing system, the packaging signal sequence has been removed from the packaging vector construct, and thus the RNA encoding viral proteins is not packaged into particles. The binding of rev protein to RRE induces transfer of RNA into the cytoplasm and suppression of splicing, resulting in the expression of viral proteins and packaging of full-length RNA into viral particles. Therefore, the inserted RRE in both packaging vector and gene transfer vector can regulate mRNA splicing of the packaging vector, which thus can allow expression of all genes. Then, mRNA of the gene transfer vector can be transferred into the cytoplasm, and packaged into the vector particles. There are some cases where *vif* and *vpr/x* have been excluded from the HIV-1 vectors (Dull, T. *et al.*, J. Virol., 72(11), 8463-71. 1998), and this suggests the possibility that proteins are not essential for packaging and functioning of vector particles. *vpr* is believed to be a factor responsible for the infectivity to nondividing cells (Heinzinger, N. K. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 91(15), 7311-5, 1994); a report describes that the type of cell, to which HIV-1 vector can transfer genes, varies depending on the presence

of *vpr* (Kim, V. N. *et al.*, J. Virol., 72(1), 811-6. 1998). It has also been reported that *nef*, which was completely excluded from the packaging vector as described above, can be a causative protein of the SIV-mediated immunodeficiency based on the evidence obtained by experiments with infection to monkey (von Gegerfelt, A. S. *et al.*, J. Virol. 73, 6159-65, 1999; Kestler, H. W. 3d., Naidu, Y. N., Kodama, T., King, N. W., Daniel, M. D., Li, Y., Desrosiers, R. C. Use of infectious molecular clones of simian immunodeficiency virus for pathogenesis studies., J. Med. Primatol. 18(3-4): 305-9, 1989). The corresponding sequence has been removed completely from the SIVagm vector constructed as described above; therefore, even if reconstituted viral particles containing viral genes derived from the packaging vector were formed, the risk of pathogenicity for such particles would be further decreased.

The lentivirus-based vector can transfer genes into cell-cycle arrested culture cells and neurons because the original lentivirus is infectious to nondividing cells (Naldini, L. *et al.*, Science: 272 263-267, 1996; Sutton, R. E. *et al.*, J. Virol., 73(5), 3649-60, 1999). When such a vector is pseudotyped by VSV-G, unlike the original SIV, the infectivity of the vector is not limited to the infection to CD4- and chemokine receptor-positive cells. The receptor of VSV-G is known to be phosphatidylserine, which is one of the phospholipids, whose molecules are present on the surface of various types of cells (Schlegel, R. *et al.*, Cell, 32(2), 639-46, 1983). Thus, the SIVagm vector which has been pseudotyped by VSV-G has a considerably wider range of infectivity. It is predicted that when viruses that are pseudotyped by membrane proteins having sialic acid binding activity are prepared based on this vector, they are capable of transferring genes to almost all types of animal cells with a high degree of efficiency.

The amount of plasmid vectors used for transfection into cells in preparation of viral vector may be adjusted appropriately. For example, the following method may be used, although it is not limited thereto.

1. Cell culture

293T cells (human embryonic kidney derived cell line) are cultured in high glucose DMEM (Gibco BRL) containing 10% inactivated bovine calf serum (BIO WHITTAKER) at 37°C, 10% CO₂.

2. Construction of vector

293T cells are plated into 6-well plastic plates at a density of 5×10^5 cells/well, and cultured for 48 hours at 37°C, 10% CO₂. Then, the culture medium in each well is replaced with 800 µl of DMEM containing 1% bovine serum albumin for use in transfection. For each well, 1200 ng of the gene transfer vector (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRΔU3, or pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF β-gal/3LTRΔU3) and 360 ng of the packaging vector (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) are mixed with any combination of expression plasmids for envelope proteins: 120 ng of VSV-G expression plasmid pVSV-G (Clontech), and 240 ng each of

expression plasmids for HA (or HN), F, and M proteins of a negative strand RNA virus (in pCAGGS), and dissolved in 100 μ l of OptiMEM. After addition of 6 μ l of PLUS Reagent (Gibco BRL), the mixture is stirred, and incubated still for 15 minutes at room temperature. Four μ l of LIPOFECTAMINE reagent (Gibco BRL) diluted in 100 μ l of OptiMEM is added to the mixture, mixed well, and incubated for additional 15 minutes at room temperature. Then, the mixture is added dropwise to the above culture of 293T cells, mixed gently, and incubated for 3 hours at 37°C, 10% CO₂. Then, 1 ml of DMEM containing 1% BSA and 15 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL) (10 μ g/ml of trypsin, instead, if HA is used) is added to the culture of each well, and incubated for 24 hours at 37°C, 10% CO₂. Subsequently, the culture medium of each well is replaced with 2 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, 7.5 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL) (5 μ g/ml trypsin for HA), and 0.01 U of NA derived from a Gram-positive bacterium (actinomycete, for example), and the culture is continued for additional 24 hr. Then, the culture supernatant is recovered, and filtrated through a filter of a pore size 0.45 μ m to obtain a vector solution.

Large-scale preparation of vector and its concentration are performed as follows. For example, 293T cells are plated into 15 cm-diameter plastic petri dishes at 5×10^6 cells/dish, and cultured for 48 hours at 37°C, 10% CO₂. The culture medium of each dish is replaced with 10 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, and the culture is subjected to transfection. For each dish, 8 μ g of the gene transfer vector and 2.4 μ g of the packaging vector are mixed with any combination of 0.8 μ g of VSV-G expression plasmid pVSV-G (Clontech), and 1.6 μ g each of expression plasmids for HA (or HN) and F proteins of a negative strand RNA virus (in pCAGGS), and dissolved in 1.5 ml of OptiMEM. 40 μ l of PLUS Reagent (Gibco BRL) is added to the plasmid solution, and mixed, and the mixture is incubated still for 15 minutes at room temperature. 60 μ l of LIPOFECTAMINE reagent (Gibco BRL) diluted in 1.5 ml of OptiMEM is added to the mixture, mixed well, and incubated for additional 15 minutes at room temperature. Then, the mixture is added dropwise to the above culture of 293T cells, mixed gently, and incubated for 3 hours at 37°C, 10% CO₂. Then, 10 ml of DMEM containing 1% BSA and 15 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL) is added to the culture in each dish, and incubated for 24 hours at 37°C, 10% CO₂. Subsequently, the culture medium of each dish is replaced with 20 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, 7.5 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL) (5 μ g/ml of trypsin, if HA is used), and approximately 0.05 to 0.5 U of NA derived from a Gram-positive bacterium (for example, actinomycete). After incubation for additional 24 hours at 37°C, 10% CO₂, the culture supernatant is recovered, filtrated through a filter of a pore size 0.45 μ m, and centrifuged at 42,490 x g, 4°C for 90 minutes (16,000 x g if F/HN is used) (TOMY SRX-201, TA21BH). The pellet is dissolved in PBS (containing 5% FCS, 2 μ g/ml polybrene), and stored at -80°C until use.

In another example, a pseudotype lentiviral vector with Influenza HA protein can be concentrated. Concentration may be performed as follows. 293T cells are plated into 15 cm-diameter plastic petri dishes at 5×10^6 cells/dish, and cultured for 48 hours at 37°C, 10% CO₂. The culture medium of each dish is replaced with 10 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, and the culture is subjected to transfection. For each dish, 8 µg of the gene transfer vector (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF LacZ/3LTRAU3) is mixed with 2.4 µg of the packaging vector (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev) and 1.6 µg of Influenza HA protein expression plasmid pCAGGS-HA, and dissolved in 1.5 ml of OptiMEM (Gibco BRL). 40 µl of PLUS Reagent (Gibco BRL) is added to the plasmid solution, mixed, and incubated still for 15 minutes at room temperature. 60 µl of LIPOFECTAMINE reagent (Gibco BRL) diluted in 1.5 ml of OptiMEM is added to the mixture, mixed well, and incubated for additional 15 minutes at room temperature. Then, the mixture is added dropwise to the above culture of 293T cells, mixed gently, and incubated for 3 hours at 37°C, 10% CO₂. Then, 10 ml of DMEM containing 1% BSA and 10 µg/ml of trypsin (Gibco BRL) is added to the culture in each dish, and incubated for 16 to 24 hours at 37°C, 10% CO₂. Subsequently, the culture medium of each dish is replaced with 20 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, 5 µg/ml of trypsin (Gibco BRL), and approximately 0.05 to 0.5 U of NA derived from a Gram-positive bacterium (actinomycete, for example). After incubation for additional 24 hr, the culture supernatant is recovered, filtrated through a filter of a pore size 0.45 µm, and centrifuged at 16,000 x g, 4°C for 1 hour (Beckman J-25I, JA-18). The pellet is resuspended in PBS (containing 5% FCS, 2 µg/ml polybrene), and stored at -80°C. Use of Influenza virus HA enables to perform gene transfer without co-expression of other envelope proteins such as VSV-G. HA pseudotype vectors can be highly concentrated by centrifugation.

In addition, a pseudotyped lentiviral vector may be prepared using two or more kinds of sialic acid binding proteins. Below described is an example of producing pseudotype lentiviral vector with envelope proteins of Influenza virus and Sendai virus.

<Cell culture>

293T cells (human embryonic kidney derived cell line) are cultured in high glucose DMEM (Gibco BRL) containing 10% inactivated bovine calf serum (BIO WHITTAKER) at 37°C, 10% CO₂.

<Construction of vector>

293T cells are plated into 6-well plastic plates at 5×10^5 cells/well, and cultured for 48 hours at 37°C, 10% CO₂. The culture medium in each well is replaced with 800 µl of DMEM containing 1% bovine serum albumin, and the culture is subjected to use in transfection. For each well, 1200 ng of the gene transfer vector (pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVF EGFP/3LTRAU3), 360 ng of the packaging vector (pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev), and 240 ng

each of expression plasmids for Sendai virus HN protein (pCAGGS-HN) and HA protein are mixed, and dissolved in 100 μ l of OptiMEM (Gibco BRL). Six μ l of PLUS Reagent (Gibco BRL) is added to the plasmid solution, mixed, and incubated still for 15 minutes at room temperature. Four μ l of LIPOFECTAMINE reagent (Gibco BRL) diluted in 100 μ l of OptiMEM is added to the mixture, mixed well, and incubated for additional 15 minutes at room temperature. Then, the mixture is added dropwise to the above culture of 293T cells, mixed gently, and incubated for 3 hours at 37°C, 10% CO₂. Then, 1 ml of DMEM containing 1% BSA and 10 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL) is added to the culture of each well, and incubated for 16 to 24 hours at 37°C, 10% CO₂. Subsequently, the culture medium of each well is replaced with 2 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin and 5 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL), and the culture is continued for 24 hr. Furthermore, the culture medium of each well is replaced with 2 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, 5 μ g/ml of trypsin (Gibco BRL), and 0.01 U of NA derived from a Gram-positive bacterium (actinomycete, for example), and the culture is continued for additional 24 hr. Then, the culture supernatant is recovered, and filtrated through a filter of a pore size 0.45 μ m to obtain a vector solution.

Vectors that are produced by the method of the present invention can be purified by a commonly known method of virus purification. Purification may be performed by publicly known methods of purification and separation, such as the above centrifugation, filtration, adsorption, and column purification, or combination of those. Thus, a viral vector comprising a membrane protein that binds to sialic acid that is substantially pure can be obtained. Herein, a substantially pure viral vector means that the viral vector is substantially free of other viral vectors capable of transferring nucleic acid into the cell. A substantially pure viral vector is preferably free of any debris of virus producing cells or other contaminants.

A viral vector produced by the method of the present invention may be provided as a composition, by appropriately combining it with a pharmaceutically acceptable carrier or vehicle. Herein, the phrase "pharmaceutically acceptable carrier or vehicle" means a substance that can be administered together with a vector without inhibiting the vector-mediated gene transfer significantly. Specifically, for example, sterilized water, saline, culture medium, serum, or phosphate-buffered saline (PBS) may be used to mix with a vector for pharmaceutical manufacturing. Furthermore, other substances, such as stabilizers or antibiotics, may be optionally included as well. The composition of the present invention may be present in a form of aqueous solution, capsule, suspension, syrup, or so. Such a composition, comprising a viral vector produced by the method of this invention, is useful as a reagent or medicine. For example, the composition may be useful as a reagent for gene transfer into a variety of cells *in vivo* or *in vitro*, or a medicine for gene therapy *ex vivo* or *in vivo*. In general, the composition is administered to a patient by a method commonly known to one skilled in the art: for example,

arterial injection, intravenous injection, intraperitoneal injection, subcutaneous injection, enteral administration, oral administration, nasal administration, or *ex vivo* administration. In particular, it is suitable for administration into the nasal or bronchial mucosa, and *ex vivo* administration into blood cells and hematopoietic cells. The amount of administration for the vector may vary
 5 depending on disease, patient's body weight, age, sex, symptoms, the objective of administration, formulation of administered composition, administration method, and gene to be transferred, but one skilled in the art should be able to determine appropriately.

A viral vector produced by the method of the present invention may be applied to gene therapy for a variety of genetic diseases. The target disease is not limited to any particular one.
 10 Examples of potential target diseases and their single responsible genes include Gaucher's disease, β -cerebrosidase (chromosome 20); hemophilia, coagulation factor VIII (chromosome X) and coagulation factor IX (chromosome X); adenosine deaminase deficiency, adenosine deaminase; phenylketonuria, phenylalanine hydroxylase (chromosome 12); Duchenne type muscular dystrophy, dystrophin (chromosome X); familial hypercholesterolemia, LDL receptor
 15 (chromosome 19); and cystic fibrosis, CFTR gene. Such genes may be integrated into chromosome using the viral vector of this invention. In addition, potential target diseases in which multiple genes are implicated include neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, ischemic encephalopathy, dementia, and intractable infectious diseases such as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). It is possible to perform a gene
 20 therapy by taking hematopoietic stem cells out of the body of an AIDS patient, introducing a SIV-based vector produced by the method of this invention *in vitro*, boosting the transcription from the genome derived from SIV before HIV infection occurs, putting back the cells into the patient body, and thus obliterating transcription factors of HIV. Furthermore, in applications for treating a chronic disease, the vector may be used for suppressing expression of VEGF and FGF-2
 25 genes in ischemic heart disease, or cell proliferation related genes such as growth factors (*e.g.*, PDGF and TGF- β), cyclin-dependent kinase, or the like for gene therapy of arteriosclerosis. In diabetes, BDNF gene may be a candidate. In addition, the method enables applications such as complementation therapy in which a gene encoding a tumor suppressor whose mutation causes cancer, such as p53 gene, is integrated into chromosomes, or a treatment surpassing the limitation
 30 of drug therapy for cancer by introducing a multi-drug resistance gene into bone marrow hematopoietic stem cells *in vitro*, and putting back into the patient blood. For gene therapy of autoimmune diseases such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, SLE, and glomerular nephritis, it is possible to suppress expression of T cell receptor, a variety of adhesion molecules (*e.g.*, ICAM-1, LFA-1, VCAM-1, and LFA-4), cytokines and cytokine receptors (*e.g.*, TNF, IL-8, IL-6, and IL-1), growth factors (*e.g.*, PDGF and TGF- β), effector molecules (*e.g.*, MMP) by
 35 antisense expression. For gene therapy of allergic diseases, it is possible to suppress expression

of IL-4, FcεR-I, and such by antisense expression. For gene therapy related to tissue transplantation, it is possible to improve the success rate of heteroplasty by humanizing the histocompatibility antigen of non-human animal donor. Furthermore, it is possible to assist therapeutically a shortage of circulating enzymes, growth factors, or such by introducing a foreign gene into chromosomes of human ES cells, and thereby complementing those genes that are otherwise deficient in embryos.

For example, interleukin-4 (IL-4) promotes differentiation of helper T lymphocytes to Th2 lymphocytes. Th2 lymphocytes, in turn, secrete IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13, cytokines mediating inflammation associated with asthma. IL-4 is one of the molecules implicated in respiration disorder that induce mucosal secretion from lung mucous membrane. IL-4 regulates the expression of VCAM-1, cell adhesion molecule that interacts with VLA 4 molecule present in the surface of eosinophiles. Through this interaction, eosinophiles can migrate from blood stream to the inflammation site in the lung tissues. IL-4 induces potentiation of B cells and production of antigen specific IgE required for triggering allergic reactions. Antigen specific IgE induces from mast cells release of inflammatory mediators such as histamine and leukotriene, which cause bronchial contraction. Because of these roles of IL-4, a vector expressing a soluble IL-4 receptor may be useful for therapy targeted at asthma patients.

Brief Description of the Drawings

Fig. 1 consists of a pair of photographs showing the result of gene transfer using virus produced using NA derived from *Micromonospora viridifaciens* (NA, right). As a control, virus was produced using NA from *Vibrio cholerae* otherwise similarly, and the same volume of culture supernatant of virus producing cells was used for gene transfection (vcNA, left).

Fig. 2 consists of a set of photographs showing the titer of virus produced using different amounts of NA from *Vibrio cholerae*. Gene transfection was performed using the same volume of culture supernatant of virus producing cells under the same conditions. The number above each panel indicates the amount of NA added (unit).

Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is explained in detail below with reference to examples, but should not to be construed as being limited thereto. The references cited herein are incorporated into this description as its part.

[Example 1] Preparation of pseudotyped SIV vector with influenza viral envelope using NA derived from Gram-positive bacterium

Cell culture

293T cells (human embryonic kidney derived cell line) (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 8392-8396 (1993)) were cultured in DMEM with high glucose (Gibco BRL) supplemented with 10% inactivated bovine calf serum (BIO WHITTAKER) at 37°C, 10% CO₂.

Vector construction

5 293T cells were seeded in a 6-well plastic culture plate at 5×10^5 cells/well, and cultured for 48 hours at 37°C, 10% CO₂. The culture medium was replaced with 800 µl of DMEM containing 1% bovine serum albumin in each well, and the cells were subjected to transfection. For each well, 1200 ng of the gene transfer vector

10 pGL3C/CMVL.U3G2/RREc/s/CMVFEGFP/3LTRAU3, 360 ng of the packaging vector pCAGGS/SIVagm gag-tat/rev, and 240 ng of HA protein expression plasmid pCAGGS-HA were dissolved in 100 µl of Opti MEM (Gibco BRL), then 6 µl of PLUS Reagent (Gibco BRL) was added, mixed, and incubated for 15 minutes at room temperature (WO01/92508). Then, 4 µl of LIPOFECTAMINE (Gibco BRL) diluted in 100 µl of Opti MEM was added to the solution,

15 mixed well, and incubated further for 15 minutes at room temperature. The mixture was added dropwise to the above culture of 293T cells, gently mixed, and the culture was incubated for 3 hours at 37°C, 10% CO₂. One ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin and 10 µg/ml of trypsin (Gibco BRL) was added to each well, and the culture was continued for 16 to 24 hours at 37°C, 10% CO₂. Then, the culture medium of each well was replaced with 2 ml of DMEM containing 1% bovine serum albumin, 5 µg/ml of trypsin (Gibco BRL), and 0.01 unit of

20 neuraminidase purified from *M. viridifaciens*. After 24 hours of culture, the culture supernatant was collected, and filtered through 0.45 µm pore filter for subsequent use. As a control, neuraminidase purified from *V. cholerae* (Roche) was used at 0.05 unit to produce vector similarly.

Gene transfer mediated by SIVagm vector

25 293T cells, a target cell, were seeded in a 6-well plastic culture plate at 1×10^6 cells/well, and cultured for 48 hours at 37°C, 10% CO₂. The culture medium was removed from the culture, and 1 ml of vector solution supplemented with 8 µg/ml (final) of polybrene (Sigma) was overlaid onto the culture, and incubated for 3 hours at 37°C, 10% CO₂ for vector infection. Then, 1 ml of culture medium supplemented with 20% inactivated bovine calf serum (BIO WHITTAKER) was

30 added to the culture, and the culture was continued for 48 to 72 hours at 37°C, 10% CO₂.

Titration of vector

 The titer of vector was measured by calculating the number of cells that successfully received gene transfer with 1 ml of vector solution. The cells were infected with 1 ml of vector solution as described above, and, after 72 hr, examined on an inverted fluorescence microscope

35 (DMIRB(SLR); Leica) at the magnitude of 200x. The number of gene transfected cells (GFP positive cells) was counted in each field, and the average of three fields was obtained. The

average was multiplied by 854.865, a coefficient obtained from the area of a field and plate, to calculate titer. The unit of titer was indicated by Transducing unit (TU)/ml. The result showed that while the titer obtained with NA from *V. cholerae* (VcNA) was 2.8×10^4 (TU/ml), the titer obtained with NA from *M. viridifaciens* (MvNA) was 1.1×10^5 , which was significantly higher than that with VcNA (Fig. 1).

[Example 2] Effect of dosage of added NA from *V. cholerae* on production of an HA pseudotyped SIV vector

Production of an HA pseudotyped SIV vector was performed as described above with the addition of varying amounts of NA derived from *V. cholerae*, and the effect was examined. The result showed that viral titers obtained with NA added at 0.01 to 0.1 U (0.005 to 0.05 U/ml) were not significantly different. Thus, the result argues against the possibility that a low titer of vectors produced using NA from *V. cholerae* is due to the low amount of NA used (Fig. 2).

Industrial Applicability

The present invention provides novel methods for producing a viral vector containing a membrane protein that binds to sialic acid in the envelope, using neuraminidase derived from Gram-positive bacteria. Neuraminidase from Gram-positive bacteria is not only available at low cost, but is also capable of producing a virus with high titer at low dose. Thus, the methods of this invention should achieve excellent cost performance for industrial production of virus in large scale. Produced vectors are suitable for clinical applications, including gene therapy.

CLAIMS

1. A method for producing a viral vector comprising a membrane protein that binds to sialic acid, comprising the steps of culturing cells producing the viral vector in the presence of a neuraminidase derived from a Gram-positive bacterium, and recovering the produced virus.
5
2. The method of claim 1, wherein said Gram-positive bacterium is an actinomycete.
3. The method of claim 2, wherein said actinomycete belongs to the Micromonosporaceae family .
10
4. The method of claim 3, wherein said actinomycete belonging to the Micromonosporaceae family is *Micromonospora viridifaciens*.
- 15 5. The method according to any one of claims 1 to 4, wherein said viral vector is a retroviral vector.
6. The method of claim 5, wherein said retroviral vector is a lentiviral vector.
- 20 7. The method according to any one of claims 1 to 6, wherein said membrane protein that binds to sialic acid is an envelope protein of a single stranded negative strand RNA virus.
8. The method of claim 7, wherein said single stranded negative strand RNA virus is a virus belonging to the Paramyxoviridae or Orthomyxoviridae family.
- 25 9. The method according to any one of claims 1 to 6, wherein said membrane protein that binds to sialic acid is an HA protein of an influenza virus.
10. A virus produced using the method according to any one of claims 1 to 9.
30

ABSTRACT

The present invention provides methods for producing a viral vector comprising a membrane protein that binds to sialic acid as a component of the envelope, using neuraminidase (NA) derived from Gram-positive bacteria. The methods comprise the steps of culturing cells producing a viral vector in the presence of an NA from Gram-positive bacteria, and recovering the produced virus. The methods of this invention enable the production of high titer virus at high cost performance. Such a viral vector is capable of transferring genes at high efficiency into cells such as blood cells and hematopoietic cells, including hematopoietic stem cells, and mucous cells including mucoepithelial cells, those not amenable to gene transfer by conventional methods, and therefore should be useful as a vector for gene therapy.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.